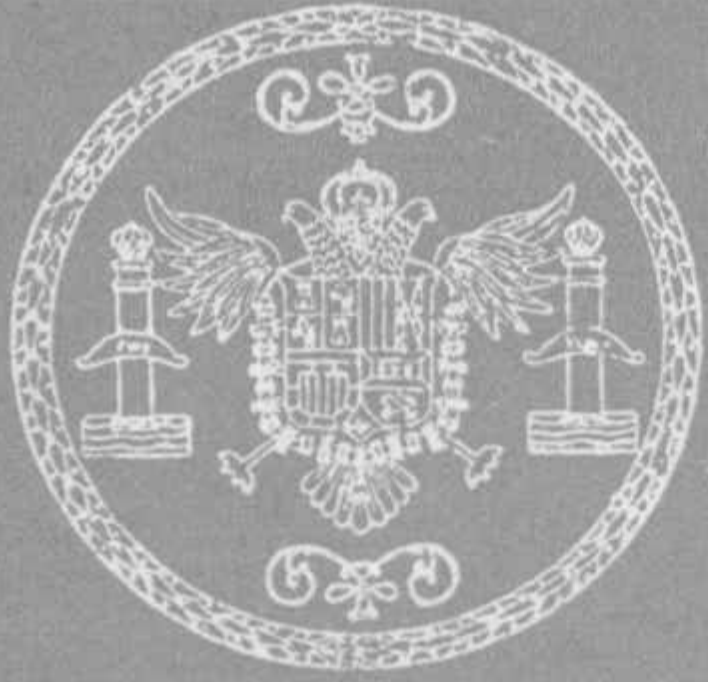


Universidad de Granada
Facultad de Ciencias



R-24-679

3/105

PRODUCCION DE VITAMINAS POR MICROORGANISMOS
SOLUBILIZADORES O NO DE FOSFATOS, AISLADOS
DE SUELOS, RIZOSFERA Y RIZOPLANA.

por

ANA MARIA BAYA PEREZ



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Fecha 11 NOV. 1975

ENTRADA NUM. 5798

Visado en Granada a 11
de Noviembre de 1975.

Fdo. ALBERTO RAMOS CORMENZANA
Departamento de Microbiología
Universidad de Granada.

Memoria presentada para
aspirar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS.
Granada a 11 de Noviem-
bre de 1975.

Fdo. ANA MARIA BAYA PEREZ
Lda en Ciencias.

Mi sincero agradecimiento

Al profesor Alberto Ramos Cormenzana, director de este trabajo, consejero, maestro y amigo.

A la Universidad Católica de Valparaíso y al Instituto Español de Emigración, por sus generosas becas.

A los compañeros del laboratorio de Microbiología de la Universidad Católica de Valparaíso, que al asumir entre todos mis obligaciones, han permitido mi estancia en España.

A los doctores Ruiz Berraquero, Barea-Navarro, J.R. Cabot y a todos los compañeros de Barcelona y Granada por su desinteresada ayuda y su inapreciable estímulo y amistad.

I OBJETO

I.- OBJETO

A lo largo de las páginas procedentes, se ha intentado plasmar en un rápido bosquejo, la evidencia, interes y consecuencias derivadas de la producción de vitaminas por la microflora del suelo. Al considerar la trascendencia de esta actividad bacteriana respecto de la nutrición del microorganismo y de la planta se ha señalado también la importancia de otro efecto de origen microbiano, cual es la solubilización de fosfatos inorgánicos.

Ante el indudable interes de ambos hechos, - hemos concebido que un estudio experimental sobre la - producción de vitaminas por bacterias del suelo quedaría notablemente enriquecido y adquiriría un mayor re-

lieve desde los puntos de vista ecológico y práctico, en el se incluyen los datos correspondientes a la capa capacidad solubilizadora de las cepas investigadas, relacionando así ambas características.

Con esta intención se ha abordado el estudio de cepas bacterianas aisladas de tres zonas edáficas: - Zona cercana a la rizosfera, rizosfera y rizoplana. La microflora presente en cada zona ofrece composición y características propias lo que justifica esta diferenciación.

Otro propósito de nuestro trabajo hace referencia a la metodología ya que experimentamos un método microbiológico para la detección de la producción de vitaminas por bacterias con el fin de encontrar una técnica rápida y semicuantitativa útil para amplios muestreos.

En resumen se propone un plan de trabajo en que podemos esquematizar los siguientes puntos:

- 1.- Contribución en la búsqueda de una técnica rápida para investigar la producción de vitaminas.
- 2.- Estudio de la producción de vitaminas por bacterias aisladas de tres zonas diferentes.
- 3.- Distribución de la producción de vitaminas según la zona de procedencia.

4.- Estudiar si se pueden relacionar los datos de pro
ducción de vitaminas con la capacidad de solubilii
zar fosfatos en los microorganismos estudiados.

II INTRODUCCION

II.- INTRODUCCION

Las vitaminas son unas sustancias orgánicas funcionales esenciales en la nutrición. Juegan un papel catalítico en la célula, generalmente como componentes de las coenzimas o grupo prostético de la enzima, podemos considerarlas dentro de una serie de sustancias a las que LILLY y STILLWELL (1945), denominan Probióticos. Por sustancias Probióticas se entiende todo metabolito que un microorganismo auxotrófico no puede sintetizar, pero que le es indispensable para elaborar su material celular. Se incluyen en este grupo - los aminoácidos, vitaminas, auxinas, giberellinas, citoquininas y otros factores de crecimiento. Todos presenen

tan un espectro de actividad característico y son activos y efectivos a concentraciones débiles (PRAMER 1968).

El requerimiento en factores de crecimiento por un microorganismo, generalmente significa una incapacidad en el proceso de síntesis. La sustancia en cuestión cumple un papel vital en el metabolismo celular y sin ella uno o mas procesos metabólicos son suprimidos, impidiendo en último termino el crecimiento. Cuando esta sustancia preformada se añade al medio - se multiplican las células y el crecimiento del microorganismo se torna aparente.

No todas las bacterias necesitan estos factores de crecimiento. Los microorganismos autótrofos se desarrollan en un medio simple que contenga solo - sales minerales. Bacterias heterótrofas como especies de Escherichia coli y Pseudomonas fluorescens son capaces de crecer rapidamente en medios que contienen - solo compuestos orgánicos tales como glucosa o lactato y sales amónicas, no siendo necesario añadir factores de crecimiento. Estos organismos son capaces de sintetizar todas las sustancias necesarias para sus procesos metabólicos esenciales. Tampoco es extraño encontrar organismos capaces de sintetizar 4 o mas vitaminas, numerosos aminoácidos etc. La diferencia en requerimientos nutricionales de los microorganismos ha sido estudiada por algunos autores como indicativo de

una secuencia evolutiva, esto involucra sucesivas pérdidas en la capacidad sintética.

No todas las vitaminas hasta ahora conocidas pueden ser consideradas como factores de crecimiento para los microorganismos. Así las vitaminas A y D no juegan ningún papel en el metabolismo bacteriano y no son sintetizadas por ellos, aunque si pueden producir alguno de sus precursores. Lo contrario sucede con las vitaminas hidrosolubles del grupo B, las cuales cumplen en las bacterias funciones de coenzima similares a las que desempeña en organismos pluricelulares.

La producción de vitaminas B por microorganismos no auxotrofos del suelo constituye un aporte en factores de crecimiento de decisiva influencia en el ecosistema edáfico.

A continuación se va a llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre la producción de vitaminas del grupo B. Sin embargo consideramos interesante realizar previamente una breve descripción de tales vitaminas antes de abordar el tema de su presencia en el suelo y su producción por microorganismos.

1.- Las vitaminas del grupo B

1.1.- Biotina

Desde el punto de vista de la actividad bio

lógica, la biotina es una de las sustancias conocidas mas potentes. Aislada de la yema de huevo por KOGL y -TONIS (1936), demostró ser activa a diluciones elevadas como factor de crecimiento de levaduras y otros microorganismos, KOGL (1938), KOGL y VAN WAGTENDONK (1938). En los años siguientes se descubrió que era un factor de crecimiento para Staphylococcus, Clostridium, Rhizobium y Streptococcus haemoliticus, hongos y otras especies. La biotina esta ampliamente distribuida en las células y tejidos, pero se presenta en pequeñas cantidades. Una de las fuentes mas ricas es el hígado que contiene solo 0.0001%. Los microorganismos las necesitan solo en pequeñas cantidades, 0.001 ug/ml o menos.

Es soluble en agua hasta 0.02% a 25°C, y soluble en alcohol etílico al 95%. Insoluble en disolventes orgánicos y estable a temperaturas normales del autoclave. Una solución diluida de biotina de 0.03% g/ml en solución de HCl 2N a 121°C durante 15 minutos, pierde su actividad para Lactobacillus casei y Streptococcus faecalis y manifiesta aproximadamente el 50% de actividad frente a Lactobacillus plantarum y Saccharomyces cerevisiae. Tratamientos similares con ácido sulfúrico 2N no muestran cambios apreciables en su actividad. Una gama de actividades atribuidas a la biotina incluye algunos aspectos del metabolismo de los carbohidratos, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y sus componentes y lípidos.

1.2.- Vitamina B₁₂

Se aisló en 1948 en forma cristalizada por varios grupos de investigadores, RICKES y col.; SMITH; SMITH y PARKER y en 1949 se suceden las investigaciones representadas en los trabajos de ELLIS, PETROW y SNOOK; WIJMENGA, LES y MIDDLEBEEK. Durante el curso de estas investigaciones se encontro una estrecha relación con los factores previamente identificados, el factor "LLD", necesario para el crecimiento de Lactobacillus lactis, el factor "proteína animal" y el factor necesario para "el crecimiento de pollos". Se estableció que la actividad de estos preparados se debía total o parcialmente al contenido en vitamina B₁₂.

Su peso molecular es de 1355. Soluble en agua hasta 1.25 g/100 ml, a 25°C. En solución ácida o alcalina y a temperatura ambiente hay una marcada pérdida de su potencia.

En una solución de NaOH 0.015N que contiene 0.2 µg/ml de dicha vitamina, se aprecia una pérdida gradual de la actividad, llegando a las 6 horas - al 90%. La destrucción de la vitamina B₁₂ en solución ácida o alcalina se acelera por el calentamiento.

Una solución de vitamina B₁₂ (74 µg/0.5 ml) sometida a 121°C durante 15 minutos, no cambia su actividad experimental en ensayos microbiológicos, -

aunque sea afectada por la luz.

La distribución de la vitamina B₁₂ en la naturaleza difiere de otras vitaminas, no se encuentra en grandes cantidades en plantas superiores ni en la mayoría de los productos vegetales. Su presencia en raíces y tubérculos se ha relacionado con la penetración de microorganismos del suelo. Muchos investigadores ponen en duda la síntesis de esta vitamina por las plantas superiores.

Esta ampliamente distribuida en alimentos de origen animal, pero se piensa que derivan de la dieta o de la síntesis microbiana producida en el tracto digestivo ya que los tejidos animales carecen de la propiedad de síntesis. Las trazas de esta vitamina en suelos y agua se describen generalmente producidas por la síntesis de microorganismos incluyendo algunas algas. La vitamina B₁₂ y compuestos relacionados están presentes en una amplia variedad de bacterias, hongos y algas verdes azuladas, siendo algunos microorganismos la principal fuente de ella. También se ha descrito en protozoos material con actividad semejante a la vitamina B₁₂.

La función en el organismo es amplia. Mediante las coenzimas cobamida y desoxi adenosil cobamida - interviene en reacciones enzimáticas, en la isomerización del glutamato, en la isomerización del metil-malonil-CoA a succinil-CoA y muchas otras.

1.3.- Acido pantoténico.

Estudiando las necesidades nutricionales de Saccharomyces cerevisiae, WILLIAM y col. (1933), encontraron un factor de crecimiento desconocido que denominaron pantoténico, es el ácido carboxílico de amplia distribución en los productos naturales, su forma funcional es la coenzima A. Es sintetizada por Lactobacillus bulgaricus, L. acidophilus, Myxobacteria flavum, Salmonella typhimurium, Staphilicoccus aureus y muchos otros. Su peso molecular es 219.2 y se encuentra normalmente formando sales con el Ca.. Es fácilmente soluble en agua y ligeramente soluble en alcohol etílico. Es estable a 121°C durante 15 minutos a pH 6, a pH 4.8 pierde un 20% de su actividad y a pH 4 casi el 40%. Es sensible a la temperatura en solución alcalina o ácida.

El ácido pantoténico juega un papel importante en el metabolismo como componente del CoA y del 4-fosfo - pantetéina.

1.4.- Tiamina.

También denominada vitamina B₁, fue obtenida en forma cristalina por JANSEN y DONATH (1926) mostrando un alto poder antineurítico. Mas tarde se deter

minó su estructura que consistía en un anillo de pirimidina y un anillo de tiazol. Es efectiva a bajas concentraciones para ciertas cepas de hongos, levaduras y microorganismos en general. Es estable en solución acuosa a pH 3 o 4. En solución ácida a pH 3.5, la vitamina puede ser calentada a 120° durante 30 minutos; siendo a pH 5, destruida rápidamente aún a temperatura ambiente.

Actúa en la decarboxilación oxidativa de los cetoácidos.

1.5.- Riboflavina

Denominada también B₂, vitamina G, lactoflavina, etc, En los años 1933 se realizaron interesantes trabajos que llegaron a su aislamiento definitivo por KUHN, GYORGY y WASGNER JAUREGG, demostrando que pequeñas cantidades de este pigmento poseía propiedades de sustancia de crecimiento. Esta fue una importante contribución para determinar sus características como vitamina. Su estructura fue determinada por KUHN, REINEMUD, WEYGARD, STROBELE, (1935). Es un factor de crecimiento esencial para lactobacillus, S. haemoliticus, S. faecalis, etc. SNELL y STRONG (1939), realizaron el primer ensayo microbiológico de vitamina basándose en la respuesta de L. casei ATCC 7469 a la riboflavina.

Una relación entre bacterias luminosas y ri-

boflavina fue señalada por DOUDOROF (1938), siendo la primera contribución relacionando esta vitamina con crecimiento microbiano y metabolismo. En general los requerimientos en riboflavina no son tan necesarios entre los microorganismos como sus necesidades en las otras vitaminas del grupo B, ya que muchos de ellos la sintetizán.

Es estable en solución ácida y en la obscuridad a 120° durante una hora en concentración de 5µg/ml de solución y un rango de pH de 2 a 5 no se destruye aunque a pH 7 se destruye casi totalmente.

Se descompone cuando se expone a la luz visible y a la radiación UV. Interviene en la cadena respiratoria y en la oxidación de productos metabólicos de carbohidratos y proteínas etc.

2.- Presencia de vitaminas en el suelo

No es necesario insistir en la importancia de las vitaminas para los seres vivos. Por ello nos limitaremos a resaltar la presencia y función de las vitaminas en el suelo por ser el tema que concretamente se abordara en el presente trabajo.

Las investigaciones llevadas a cabo durante años coinciden en que las vitaminas estan comunmente

presentes en el suelo. Cantidades significativas de las mismas se encuentran principalmente en suelos fértiles, (LILLY y LEONIAN 1939, ROULET 1948, ROULET y SHOPFER - 1950), siendo mas abundante cerca de la superficie.

WILLIAM y SPIES (1938), expusieron la teoría de que la tiamina podría estar presente en el suelo, pero fueron LILLY y LEONIAN (1939), quienes lo confirmaron utilizando hongos auxotróficos para dicha vitamina. Con Sordaria fumicola los mismos autores descubren la presencia de biotina.

Desde entonces se han sucedido las investigaciones que pretendia la búsqueda de tales substancias en el suelo. Asi MULLER (1941), señala la presencia de tiamina, lactoflavina, piridoxina, inositol y ácido nicotínico en numerosos suelos de praderas y bosques. - SHOPFER (1943), encuentra grandes cantidades de tiamina en suelos de bosques, praderas y campos cultivados. En ese mismo año CARPENTER observa la presencia de riboflavina en los suelos.

Posteriormente ROULET y SHOPFER (1950) ponen en evidencia la presencia en el suelo de numerosas vitaminas del grupo B, entre ellas riboflavina, inositol, piridoxina, ácido nicotínico y ácido para amino benzoico.

LOCHHEAD y THEXTON (1951-1952), trabajando con microorganismos auxotroficos de la vitamina B₁₂, de

mostraron que podían reemplazar esta por extractos de suelo. Esto se debe a que tal sustancia existe en el suelo en proporción de 2 a 5 $\mu\text{g/g}$ de suelo; LOCHHEAD y BURTON (1956), DUDA, y col. (1957) encuentra altas concentraciones de vitamina B₁₂ en suelos ricos en materia orgánica, llegando en suelos de turba a 50 $\mu\text{g/g}$ de suelo, y AQUARONE y PICCI (1961) estudian el contenido en riboflavina de los suelos y encuentran variaciones en las cantidades que dependen de la calidad y tipo de suelo.

Son SZEGI y GULYAS (1964) quienes utilizando técnicas microbiológicas determinan el contenido en tiamina, biotina y ac. nicotínico en suelos de chernozem y en suelos forestales. Cantidades significativas de tiamina y biotina están presentes en suelos de chernozem mientras que en suelos forestales la presencia de ácido nicotínico es considerable.

FURUSAKA (1968) señala que es la vitamina presente en mayor proporción en suelos de arrozales, el ácido nicotínico encontrado también en dichos suelos, cantidades importantes de piridoxina y biotina. Es HAGEDON (1969) quien investiga la presencia de tiamina en suelos, observando que en el horizonte A el contenido es alto, mientras que en el horizonte B el contenido es menor y esta en relación con el número de microorganismos existentes.

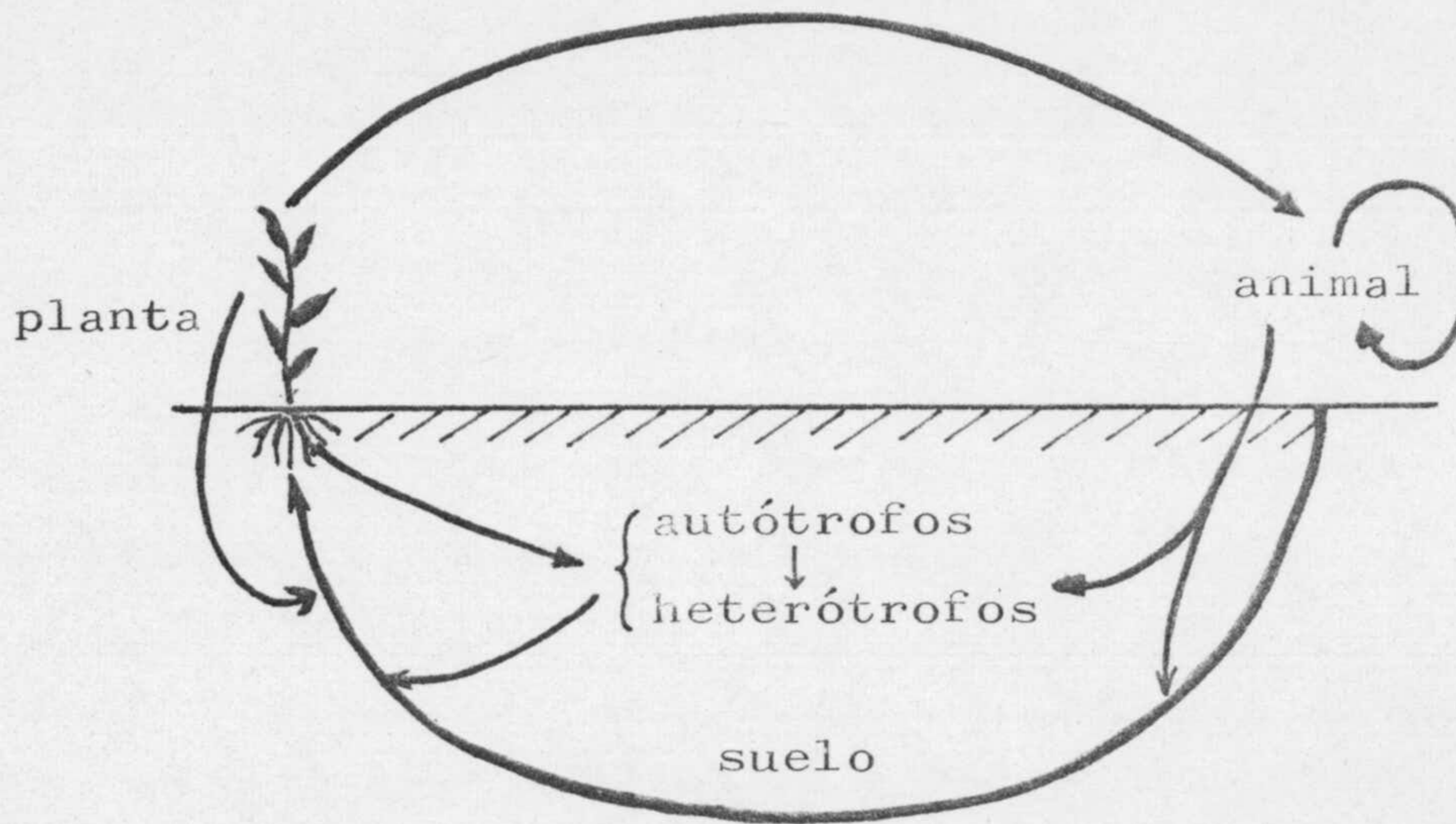
En un trabajo de revisión ALEXANDER (1971) opina que las vitaminas presentes en el suelo son , tiamina, biotina y vitamina B₁₂.

3.- Importancia de las vitaminas en el suelo.

En 1936, KOGL y HAAGEN-SMIT fueron los primeros en demostrar el efecto directo de las vitaminas en las plantas superiores . Trabajando con embriones de guisantes pusieron de manifiesto que la adición de tiamina y biotina al medio, estimulaba el crecimiento del tallo y de la raíz. WHITE (1937) , RCBBIN y BARLEY (1937) llegan a la misma conclusión.

Se han propuesto diferentes ciclos en lo que respecta a la producción y regresión de las vitaminas en el suelo , daremos una breve explicación sobre el esquemático por BOAS y KOGL y citado por SHOPFER en --- 1952, del cual podríamos obtener datos acerca de la importancia que las vitaminas presentes en el suelo tienen para los vegetales , microorganismos y posible relación entre ambos.

CICLO DE LAS VITAMINAS



El suelo recibe un aporte de materia orgánica consistente en productos de excreción y restos orgánicos de animales y vegetales. Esta materia constituye el sustrato de la microflora heterótrofa que procede a su mineralización. El conjunto de microorganismos autótrofos y heterótrofos determinan tanto por su actividad sintética como por la liberación de sus componentes protoplasmáticos al morir, un aporte de vitaminas al suelo. También hay que considerar la influencia de los exudados de las raíces sobre la microflora rizosférica, mediante la secreción de diversas sustancias activas (entre ellas vitaminas).

La influencia que puedan tener las vitaminas presentes en el suelo, sobre la planta , es objeto de discusión. Las plantas constituyen una fuente de vitaminas para los animales, los cuales ademas se benefician de la síntesis de vitaminas por parte de su microflora intestinal; con lo que se complementa este ciclo.

El ciclo propuesto demostraba en primer lugar la complejidad de las relaciones existentes entre los diferentes tipos fisiológicos de los microorganismos del suelo. En estas relaciones los factores vitamínicos juegan un importante papel.

Este ciclo tal como se planteaba resultaba muy simplificado, ya que las vitaminas no actuan aisladamente sino en relación con los demas constituyentes del suelo particularmente con los oligoelementos.

SHOPFER(1952), insistio en la idea de que en cada etapa del ciclo hay problemas esenciales imperfectamente resueltos, ya que se estan refiriendo a la naturaleza datos obtenidos en el laboratorio. Por lo tan to concluye que este ciclo debe ser ante todo considerado como un plan de investigación que llegue a comprobarlo en todos los detalles. Ello obliga a un análisis sistemático de los factores vitamínicos del suelo , en relación con la vegetación terrestre, microflora y microfauna del mismo ; un estudio de la evolución de can tidades de vitaminas en función del tiempo y del clima.

Tambien sería indispensable un estudio de la permeabilidad radicular para las distintas vitaminas en los suelos normales.

El cultivo de tejidos indudablemente ha proporcionado un considerable impulso para estos estudios. Aunque las condiciones bajo las cuales se cultivan tejidos son siempre artificiales, se puede poner de manifiesto que algunos órganos de las plantas, principalmente raíces, tienen una pequeña capacidad para sintetizar dichos factores de crecimiento. Se sabe que en condiciones naturales la demanda en vitaminas de un órgano se suple con la actividad sintética de otro, pero cuando no existe una fuente interna aprovechable, esta deficiencia puede ser suplida por absorción desde el exterior. Los trabajos de CARPENTER (1943), son interesantes en este sentido. Este autor demuestra que plantas decapitadas de tomate, tabaco, fucsia y zanahoria, son capaces de absorber riboflavina de una solución acuosa de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ya que las raíces de estas plantas contenían varias veces mas riboflavina que los patrones mantenidos en agua destilada.

Trabajos sucesivos han demostrado que tanto los embriones como los órganos aislados de los vegetales superiores requieren un aporte externo de vitaminas para su desarrollo, SHOPFER (1943). Otro ejemplo claro de la necesidad de vitaminas para el desarrollo

vegetal es el hecho de que los cultivos de tejidos in diferenciados de plantas superiores requieren en todos los casos una adición externa de tiamina, ácido nicotínico y piridoxina, WHITE (1946)

Reconociendo la dependencia de las plantas verdes respecto a vitaminas y hormonas para su desarrollo normal, SCHMIDT (1950) sugiere la posibilidad de beneficiar al vegetal con un aporte externo de estas - substancias. Diversos autores citados por MACURA(1966), admiten que las plantas serían capaces de absorber vi-taminas producidas en la rizósfera, lo cual favorecerá el desarrollo de órganos y funciones de la planta. Aunque este efecto estimulante se manifiesta fundamentalmente cuando la actividad sintética de la planta está limitada por alguna razón.

En un trabajo reciente REMPKE (1973), pone - en evidencia que las vitaminas producidas por los mi-croorganismos y liberadas al medio circundante son to-madas por la planta produciendo en ellas un efecto fa-vorable en la respiración de las raíces, síntesis de -proteínas y en el intercambio de nutrientes.

4.- Origen de las vitaminas en el suelo.

4.1.- Aporte en vitaminas al suelo de restos animales y vegetales.

Como es sabido, los abonos orgánicos ejercen efectos favorables en el desarrollo de las plantas, debido a su aporte en elementos nutritivos, vitaminas, hormonas, etc. y a la modificación de las condiciones físicas del suelo.

En relación con las vitaminas, se han realizado numerosas investigaciones. En tales trabajos se ha destacado la primordial importancia de los microorganismos en la degradación de los abonos y el considerable efecto que ello puede tener para la planta.

BOONER y GREENE (1938), realizaron estudios en abonos orgánicos concluyendo que contienen cantidades apreciables en tiamina. Trabajos posteriores de estos autores (1939) comprueban la influencia que tiene esta vitamina sobre el desarrollo del tallo y de la raíz.

Utilizando técnicas microbilógicas para valoración de vitaminas STARKEY (1942), constata que después de la maduración de los compost hay una pérdida importante de riboflavina y ácido pantoténico. Sin em-

bargo CARPENTER (1943), estima que a pesar de ello es la principal fuente de vitaminas en el suelo.

En 1944 STARKEY estudia la evolución de las vitaminas durante la obtención del compost, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, observando que al comienzo hay un aumento considerable de vitaminas (del 200 al 300 %), que coincide con una abundante proliferación de microorganismos . Luego y a medida que la descomposición de la materia orgánica va ocurriendo el contenido baja, siendo los valores finales semejantes a los iniciales. Los fenómenos varían en el mismo sentido en aerobiosis que en anaerobiosis , aunque son mas acentuados en aerobiosis.

Para ROULET y SHOPFER (1950), una fuente importante de vitaminas es el estiércol, que contiene hasta 1.2 u de biotina y 11 u de tiamina por 100 gramos.

En 1951 STARKEY estudia la degradación de la riboflavina y ácido pantoténico en suelos. Para ello incorpora en unos suelos vitamina pura y en otros restos vegetales en descomposición, determinando el contenido de las mencionadas vitaminas, antes y durante la experiencia. Encuentro que la vitamina pura se descompone rapidamente en suelos bacterizados; mientras que en los suelos estériles se mantiene igual. Después de esterrar los restos vegetales (hierba o paja de a-

vena) hay una evolución parecida a la que ocurre en a bonos, aumento en un principio y luego disminuye. Esto demuestra el papel de los microorganismos en la síntesis y destrucción de las vitaminas.

DUDA y col (1957), encuentran concentraciones elevadas de vitamina B₁₂ en suelos ricos en materia orgánica. Así en suelos de turba alcanzan valores de 50 mg por gramo de suelo. Los fertilizantes orgánicos en general aumentan el contenido de la microflora que va en relación con el aumento de vitamina B₁₂, -- VOZNYAKOVSKAYA y AVRORA (1968).

SZEGI (1966), estudia la influencia sobre la síntesis de vitaminas de la hemicelulosa y lignina incorporadas a Chernozem calcáreos. La hemicelulosa en mayor proporción y la lignina en proporciones mas bajas, producen un aumento en la síntesis de tiamina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, piridoxina y biotina.

4.2.- Aporte por exudados de raíces.

Es un hecho conocido que las plantas eliminan sustancias por las raíces y entre ellas están las vitaminas. Esta circunstancia tiene una gran influencia sobre el suelo circundante, principalmente en la rizósfera.

WEST (1939) observó que la tiamina y la biotina son escretadas por las raíces de lino que crecían en condiciones estériles, aunque la validez de estas experiencias han sido discutidas, principalmente en lo que concierne al método, SULOCHANA (1962).

ROVIRA y HARRIS (1961), investigan la presencia de vitaminas del grupo B en los exudados de raíces de 10 plantas diferentes (tomate, alfalfa, guisante y clavel), encontrando concentraciones elevadas de biotina, pantotenato y niacina, trazas de riboflavina y tiamina, estando siempre ausente la piridoxina.

En la revisión bibliográfica de ROVIRA (1962) se muestra un cuadro resumen de las vitaminas encontradas en los exudados de raíces. El autor citado pone de relieve que tales sustancias son sintetizadas en pequeñas cantidades, aunque suficientes para influir en la florarizosférica (Tabla II.1)

Después de la revisión de ROVIRA, otros trabajos científicos han seguido aportando ideas y conocimientos sobre el tema. En uno de dichos trabajos SULOCHANA (1962), emplea mutantes de Neurospora crassa y Neurospora sitophila y realiza una estimación cuantitativa de algunas de las vitaminas del grupo B en exudados de raíces de plantas de algodón. Los resultados obtenidos indican claramente la presencia de tiamina, biotina, ácido p-amino benzoico, piridoxina y trazas de inositol.

Tabla N° II.1.- Tipos de vitaminas encontradas en las dos raíces de diferentes plantas.

Vitaminas	Planta	Referencia
Biotina tiamina	lino arroz, haba	WEST (1939); BHUNANESWARI y SULOCHANA (1955)
biotina tiamina	maiz guisante	MESHKOV (1960)
Factor M	pino, guisante tomate	MELIN y RAMA DAS (1954)
n-metil nicotin	rábano	DODMAN, KERR y ATKINSON (Com. pers. al. autor del trabajo).
biotina pantotenato niacina	varias especies de claveles, al falda, tomate, - guisante	ROVIRA Y HARRIS (1961)

BLONDEAU (1968) estudia la cinética de la evolución de las vitaminas en el curso del desarrollo de colza (Brassica napus oleífera). Para la dosificación de la vitamina utilizada Lactobacillus viridescens ATCC 12706 (tiamina), Streptococcus faecalis ATCC -- 8043 (ácido fólico) y Lactobacillus plantarum ATCC -- 8014 (biotina, ácido nicotínico y ácido pantoténico), realizando la lectura por nefelometría. En los cultivos estériles la eliminación de biotina, ácido fólico, ácido nicotínico, ácido pantoténico y tiamina, es proporcional al tiempo de germinación siguiendo una curva ascendente . En presencia de una microflora telúrica hay una disminución de biotina, ácido nicotínico y un aumento de ácido fólico y en menor grado de ácido pantoténico. En cuanto a la tiamina, los valores permanecen constantes.

HATTORI (1973), resume que son 10 las vitaminas identificadas en exudados de una amplia variedad de plantas. El pantotenato y la niacina están generalmente presentes, aunque la tiamina se encuentra solo en contadas ocasiones. La aparición esporádica de tiamina está en relación con especies de Rhizobium , muchos de los cuales, requieren esta vitamina como un factor esencial.

4.3.- Aporte de los microorganismos.

Los microorganismos que se desarrollan satisfactoriamente en medios sencillos (azúcares y sales minerales), deben poseer capacidad para sintetizar todos los factores que precisen para su crecimiento. También aquellos otros que necesitan uno o varios de dichos factores preformados son capaces de sintetizar otros, PETERSON y PETERSON (1945). Tanto en un caso como en otro, existen microorganismos que bajo determinadas condiciones, pueden producir una o mas vitaminas - en cantidades superiores a sus propios requerimientos.

En un trabajo de revisión RIVIERE (1960) refiere que para numerosos autores de la escuela canadiense encabezada por LOCHHEAD, la síntesis de vitaminas - del grupo B por bacterias del suelo parece ser importante y lo explican por el hecho de que numerosos microorganismos de la flora intestinal que tienen esa propiedad terminan por ser incorporados al suelo.

Diversos autores han estudiado la síntesis de vitaminas por bacterias del suelo. Así ROBBINS y col (1950), utilizando Euglena como microorganismo auxotrófico y siguiendo métodos turbidimétricos de lectura, comprobaron que mas del 50% de los microorganismos que se desarrollan en placas de agar extracto de suelo producían vitamina B₁₂ y BURTON y LOCHHEAD (1951), de-

terminaron por el método de ensayo en placa de FOSTER, LALLY y WODRUFF (1949), la producción de vitamina B₁₂ en 537 bacterias aisladas del suelo, semillas, tierras de labranza y excrementos de gallina, siendo un 64.6 % productoras de dicha vitamina.

Pero fueron LOCHHEAD y THEXTON (1952) quienes demostraron a través de un estudio ecológico que las bacterias del suelo sintetizan vitamina B₁₂, permitiendo el crecimiento de bacterias que la necesitan. Para comprobar esto utilizan los filtrados de los cultivos de las bacterias a investigar y lo prueban frente a una cepa auxotrófica que es Lactobacillus leichmanii.

La producción de vitamina B₁₂ acaparó la atención de un gran número de científicos. Todos los trabajos correspondientes los recoge la revisión de DARKEN (1953), en la que se pone de manifiesto que un gran número de microorganismos son capaces de sintetizar vitamina B₁₂. SHAVLOVSKY (1954-1955) encuentra en cultivos de Pseudomonas, tiamina, ácido nicotínico y biotina, siendo también de gran importancia la producción de vitamina B₁₂, GYLLENBERG y HACMAN (1960) y DANIELS (1970).

Una revisión hecha por DEMAIN (1972), señala un amplio grupo de microorganismos productores de riboflavina, principalmente Clostridium. En 1973 HOUSTON y MC VEGH, comunican la síntesis de tiamina por Phycomyces blakesleeanus y en 1974 STEINBERG y col la síntesis

de cobalamina, piridoxina, riboflavina, biotina , ácido nicotínico y ácido pantoténico por Achromobacter.

Es LOCHHEAD (1957) quien inicia los estudios comparativos entre suelo testigo, rizósfera y rizoplana , en cebada y centeno . Aislo 316 bacterias determinando en ellas su capacidad para producir tiamina, biotina, riboflavina y vitamina B₁₂ . Para ello utiliza el filtrado del cultivo de cada cepa y lo prueba frente a un microorganismo auxotrófico . En todas las zonas la riboflavina es sintetizada por el mayor porcentaje de bacterias, seguida por la tiamina y la vitamina B₁₂ , siendo pequeño el porcentaje de productoras de biotina . COOK y LCCHHEAD (1959) , afirman el hecho de que los microorganismos aislados de la rizósfera y rizoplana del trigo producen una cantidad mayor de vitaminas que en suelos alejadas de esta. Los resultados se reseñan en la tabla siguiente.

Tabla II.2.- Porcentaje de bacterias del suelo tes-
tigo, rizósfera y rizoplana de trigo, que sintetizan -
factores de crecimiento en cultivo puro.

Factores de crecimiento	Suelo control	Rizosfera	Rizoplana
Tiamina	28.0	61.6	68.0
Biotina	14.0	33.3	43.0
Ac. pantotenico	32.7	71.7	74.0
Ac. folico	26.2	58.5	61.0
Ac. nicotinico	30.8	71.7	74.0
Riboflavina	27.1	72.7	76.0
Piridoxina	18.7	56.6	58.0
Vitamina B ₁₂	14.0	20.2	27.0

Creemos conveniente señalar la influencia - que ejercen los macronutrientes (N-P-K), al aumentar el contenido de vitaminas del suelo, de la rizósfera así como en las plantas, DORING (1961), GUPTA y DAS - (1961), VOZNYAKOVSKAY y AURORA (1968) y EPACHINOV - (1970-1971).

La adición de oligoelementos tales como Mo, B, Mn, Zn, Cu y Co influyen sobre la microflora rizosférica resultando de ello un aumento en vitaminas, BER SHOVA y KOZLOVA (1962).

Son KATZNELSON y ROUATT (1957 a y b), quienes resaltan el hecho de que las bacterias de la rizoplana producen un mayor porcentaje de vitaminas.

Diversos autores han investigado la rizosfera en cuanto a la producción de vitaminas. Así SMALLII (1959) estudia la formación de tiamina, vitamina B₁₂, ácido nicotínico y ácido pantoténico en bacterias aisladas de la rizósfera del trigo. Para ello utiliza cepas auxotróficas comprobando que la mayor producción correspondió a cultivos de Pseudomonas.

SMALLII (1960), VONIAKOVSKAI (1961) y PANTOS (1961) determinaron en cultivos de bacterias de la rizosfera, biotina, riboflavina, ácido nicotínico y piridoxina.

SANKARAM y SUNDARA RAO (1962), aislaron bacterias de la rizósfera de diversos cultivos y de zona no rizosférica. En todos ellos el porcentaje de bacterias capaces de producir vitamina B₁₂ fue generalmente mas alto que el de las no productoras y en la ri--zosfera el porcentaje fue mayor que en la zona no ri-zosférica. La cantidad de vitamina se determino siguiendo el método oficial de la USP con Lactobacillus leichmanii ATCC 4797 como microorganismo auxotrófico. Si -guiendo en la línea de trabajo, SUNDARA RAO y VENKATA-RAMAN (1963), resaltan el hecho de que las bacterias

que sintetizan vitamina B₁₂ son mas abundantes en la rizósfera, aunque gran parte de la microflora del suelo es capaz de sintetizar dicha vitamina.

Los trabajos de MIL'KO y ROBOTNOVA (1969) y de ANDREYUC y KOZLOVA (1971) han contribuído de una forma apreciable en el conocimiento del contenido en riboflavina, biotina y vitamina B₁₂ en micobacterias.

Por otro lado RICKES y col (1948) dieron a conocer la presencia de especies de Actinomycetes productores de vitaminas y BURTON y LOCHHEAD (1951) comprueban que el 66.6 % de los 676 aislados del suelo producían vitamina B₁₂, SAUNDERS, OTTO y SYLVESTER (1952) que el 100 % de las 90 cepas aisladas producían esta vitamina, aunque solo 4 de ellas lo hicieron en concentraciones altas, siendo identificado uno de ellos como Streptomyces griseus.

Años mas tarde KRASILNIKOV (1958) pone en evidencia la formación de tiamina, riboflavina, pantotemato y vitamina B₁₂ por Actinomycetes y AQUARONE y PICCI (1961) investigan la biosíntesis de vitamina B₁₂ en especies de bacterias, hongos y Actinomycetes aislados del suelo, concluyendo que mientras las tres especies de Actinomycetes no mostraban actividad, las bacterias y hongos produjeron cantidades pequeñas. Solo Penicillium schisopenum y P. fantimellum dieron valoraciones altas.

Por otro lado GEORGIEVA y SHEIKOVA (1963), aislaron 240 cepas de Actinomyces de 41 plantas, de ellas 175 producían vitamina B₁₂ en cultivo puro. En 1967 ANDREYUC y KOGAN aislaron Actinomyces del suelo. El estudio fue hecho en cultivos en medio líquido investigándose la presencia de vitaminas tanto en el sobrenadante como en las células, encontrándose que es activo para tiamina, biotina, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico y ácido pantoténico.

ABOU-ZEID (1972) estudio la producción de vitamina B₁₂ por distintas especies de Streptomyces, utilizando diferentes medios de cultivo.

En relación con Rhizobium y Azotobacter - hay una amplia bibliografía al respecto. Se sabe que Azotobacter crece en medios carentes de factores de crecimiento y es capaz de sintetizar biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, riboflavina, tiamina e inositol. Mientras que si especies de Rhizobium necesitan algunas de las vitaminas del grupo B otras en cambio son capaces de sintetizarlas.

En 1952 BURTON y LOCHHEAD demuestran la síntesis de vitamina B₁₂ por diversas especies de Rhizobium. Siguiendo en la misma línea de investigaciones LEVIN, FUNK y TENDLER (1954), ensayan cultivos de Rhizobium meliloti, R. trifoli y R. leguminosarum, aislados de leguminosas, comprobando que todos producían esta

cían esta vitamina. Los Rhizobium aislados de nódulos ^{rosados} producían mas vitaminas que los aislados de nódulos blancos. Un análisis de estos nódulos demostró que la concentración de vitamina B₁₂ en nódulos rosados era 400 veces mayor que en nódulos blancos.

Posteriormente VYAS y PRASAD (1955) y --- SUNDARA RAO y VENKATARAMAN (1963), vuelven a confirmar la síntesis de B₁₂ por Rhizobium y BAGDASARIAN (1965) y SANDRAK (1971), para especies de Azotobacter.

En un interesante trabajo, SHEMAKHANOVA y SIDORENKO (1971), aislaron cepas activas de R. lupini, R. meliloti y R. leguminosarum de nódulos de guisantes y habas. Aquellos nódulos que despues de la bacte rización mostraban una mayor actividad en la fijación de nitrógeno, eran mejores productores de vitamina - B₁₂. Esta correlación no se encontro entre ácido pan- toténico y piridoxina y fijación de nitrógeno, ----- SHEMAKHANOVA y OLEINIKOV (1972). Este hecho anterior- mente había sido tratado por BURTON y LOCHHEAD (1952) y DAMERY y ALEXANDER (1969), sin encontrar relación - alguna.

5.- Dinámica de las vitaminas en el suelo.

Como ya hemos visto, el aporte de vitaminas en el suelo proviene de fuentes diferentes y la cantidad final que encontramos depende no solo de las existentes en la materia orgánica, la sintetizada por las bacterias o la excretada por las raíces, sino también del hecho de que estas vitaminas pueden ser destruidas por los microorganismos.

Se han realizado interesantes trabajos sobre el tema de la destrucción de las vitaminas por los microorganismos. Es FOSTER (1943) el primero que aisla del suelo una bacteria identificada como Pseudomonas riboflavins que oxida completamente el grupo ribosa - de la riboflavina a CO_2 y H_2O , dejando intacta el resto de la molécula. MIRICK en el mismo año, aisla una bacteria que degrada el ácido p-amino-benzoico dando CO_2 y H_2O como productos finales. Los trabajos de -- WILLIAMS y KOSER (1947) y MEZTGER (1947) señalan que bacterias aisladas del suelo descomponían activamente el ácido nicotínico, la tiamina y el ácido pantoténico.

También debemos tener en cuenta la producción de sustancias antibióticas que se comportan como antimetabolitos para aminoácidos y vitaminas descubierto en Actinomycetes por KOROBKOVA y col (1971).

Esto demuestra que la concentración de una vitamina en un momento dado, depende del equilibrio dinámico entre los procesos de síntesis y de destrucción y que en dicho equilibrio juegan un importante papel los microorganismos del suelo.

6.- Métodos utilizados en la valoración de las vitaminas.

6.1.- Métodos biológicos.

Los primeros análisis de las vitaminas se hicieron empleando métodos biológico. Los efectos específicos producidos por las vitaminas en animales de experimentación sirvieron de base para la valoración cuantitativa de las mismas. A pesar de la indiscutible ventaja que les proporciona su mayor selectividad, su empleo se ha limitado ya que requiere un mayor tiempo para su ejecución, son normalmente caros y su límite de error es con frecuencia amplio. Su uso ha quedado reducido para casos limitados.

6.2.- Métodos químicos y fisico-químicos

En los últimos 20 años los métodos biológicos se han visto reemplazados progresivamente por técnicas químicas y fisico-químicas tales como las espectrofotométricas, fluorométricas, polarográficas, gravimétricas y colorimétricas. Estos procedimientos que son de amplio uso en la industria farmacéutica resultan mas rápidos y económicos que los biológicos y en general sus límites de error son mas pequeños. Sin embargo debido a la escasa especificidad que poseen nor-

malmente, deben emplearse con ciertas reservas, o bien confirmar su exactitud mediante exámenes biológicos o microbiológicos. La especificidad de estos métodos puede aumentarse notablemente si la vitamina objeto del análisis se logra aislar a partir de la muestra analítica con el mayor grado de pureza posible.

6.3.- Métodos microbiológicos.

Han sido ampliamente utilizados en la determinación de las vitaminas del grupo B debido principalmente a su gran sensibilidad y alta especificidad que puede incrementarse mediante la aplicación de métodos modernos de separación (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en capa fina etc.).

Fundamento : Estos métodos se basan en la existencia de microorganismos que solamente se multiplican y producen ciertos metabolitos detectables, en presencia de determinadas vitaminas. que ellos son incapaces de sintetizar. Si estos microorganismos, procedentes de cultivos en medio óptimo, se inoculan en un medio nutritivo líquido que carece de alguno de los compuestos vitamínicos que necesitan, no habra desarrollo, permaneciendo el medio transparente por falta de crecimiento. Cuando a dicho medio carencial se añaden proporciones adecuadas del sustrato que contiene la vitamina en cues-

ción, los microorganismos se multiplicaran en función de la cantidad presente, de dicha vitamina, que actúa como factor limitante del crecimiento. Esta multiplicación por regla general ocasionara una turbidez en el medio, lo cual se mide fotométricamente. Otra medida del crecimiento microbiano puede efectuarse determinando cuantitativamente los productos metabólicos formados en presencia de la vitamina, tal es el caso del Lactobacillus (determinación del ácido láctico).

La técnica semicuantitativa en placa obedece al mismo fundamento, con la diferencia de que la cepa auxotrófica se inocula en un medio carencial sólido. La presencia de vitaminas se pondría de manifiesto por el crecimiento del microorganismo auxotrófico.

Características de los microorganismos empleados : Los requerimientos que deben satisfacerse para garantizar un procedimiento sencillo, reproducible y exacto, limitan notablemente el número de microorganismos apropiados para las determinaciones microbiológicas. Cabe citar las siguientes condiciones:

- el microorganismo debe ser específico para la vitamina que se ha de determinar.
- las propiedades de la cepa deben de permanecer constantes después de un prolongado período de resiembras.
- las manifestaciones vitales del microorganismo deben proporcionar efectos fácilmente medibles.

- los microorganismos empleados deben poseer un metabolismo intenso de tal modo que los análisis puedan llevarse a cabo en el menor tiempo posible.
- no deben ser patógenos para evitar exponer al analista al riesgo de infecciones y hacer innecesariamente -difícil el procedimiento analítico.

Descripción somera de estos métodos.

Considerando su interés haremos una breve reseña de algunas de las valoraciones en las que intervienen microorganismos auxotróficos.

6.3.1.- Método de valoración en medio líquido.

El inóculo se prepara de 16 a 18 horas antes de comenzar el experimento, pasando los microorganismos de los cultivos en agar inclinado a un caldo de inoculación.

Se centrifuga el cultivo que ha crecido en el caldo de cultivo y se resuspenden los microorganismos en solución salina estandar o bien en el medio de ensayo desprovisto de vitaminas. Esta operación se repite varias veces con objeto de quitar las sustancias que puedan interferir el análisis.

El inóculo se valora determinando el número

de microorganismos viables por ml.

Se realizan tres diluciones de la muestra - problema (cada una con 10 repeticiones) de modo que el resultado aproximado caiga en la región central lineal de la curva. Si la concentración es totalmente desconocida la dilución óptima debe determinarse por experimentos previos.

Las diluciones de la solución de calibración se mezclan con el medio de ensayo y se inoculan e incuban en las mismas condiciones que las diluciones de la muestra.

Lectura de resultados

1 - Por turbidimetría : La turbidez se mide en términos de porcentaje de luz transmitida, o bien densidad óptica del cultivo. Se obtiene la media aritmética de todas las repeticiones empleadas y se realiza la curva con los valores de turbidez (ordenadas) y las concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ en abscisas. Uniendo los puntos se obtiene la curva de calibración que se emplea para convertir los valores de las diversas diluciones de la muestra en las correspondientes concentraciones de vitamina expresadas en $\mu\text{g/ml}$. Al multiplicar las concentraciones obtenidas a partir de la curva de calibración por los factores de dilución correspon

dientes, se obtiene el contenido por ml o por gramo de muestra original.

2.- Por titulación de ácido : Después de un período de incubación de 72 horas, el crecimiento de bacterias que producen ácidos en los medios de cultivo, (Lactobacillus, Streptococcus) se valora por titulación de estos con NaOH 0.1 N. La curva se realiza como en el caso anterior, poniendo en abscisas las concentraciones de vitamina en $\mu\text{g/ml}$ y en ordenadas los ml de NaOH utilizados.

3.- Recuento directo en hemocitómetro : Este método se aplica particularmente en casos de protozoos y espiroquetas.

4.- Por gravimetría : Este método se emplea en caso de utilizar un hongo como microorganismo auxotrófico . Se sigue una técnica similar a las anteriores, realizando la lectura por peso seco de micelio.

6.3.2.- Méto de valoración en medio sólido

Se trata de procedimientos cuantitativos en placa en los que se valora el halo de crecimiento del microorganismo, son similares a los empleados en las valoraciones microbiológicas de antibióticos. En el mé

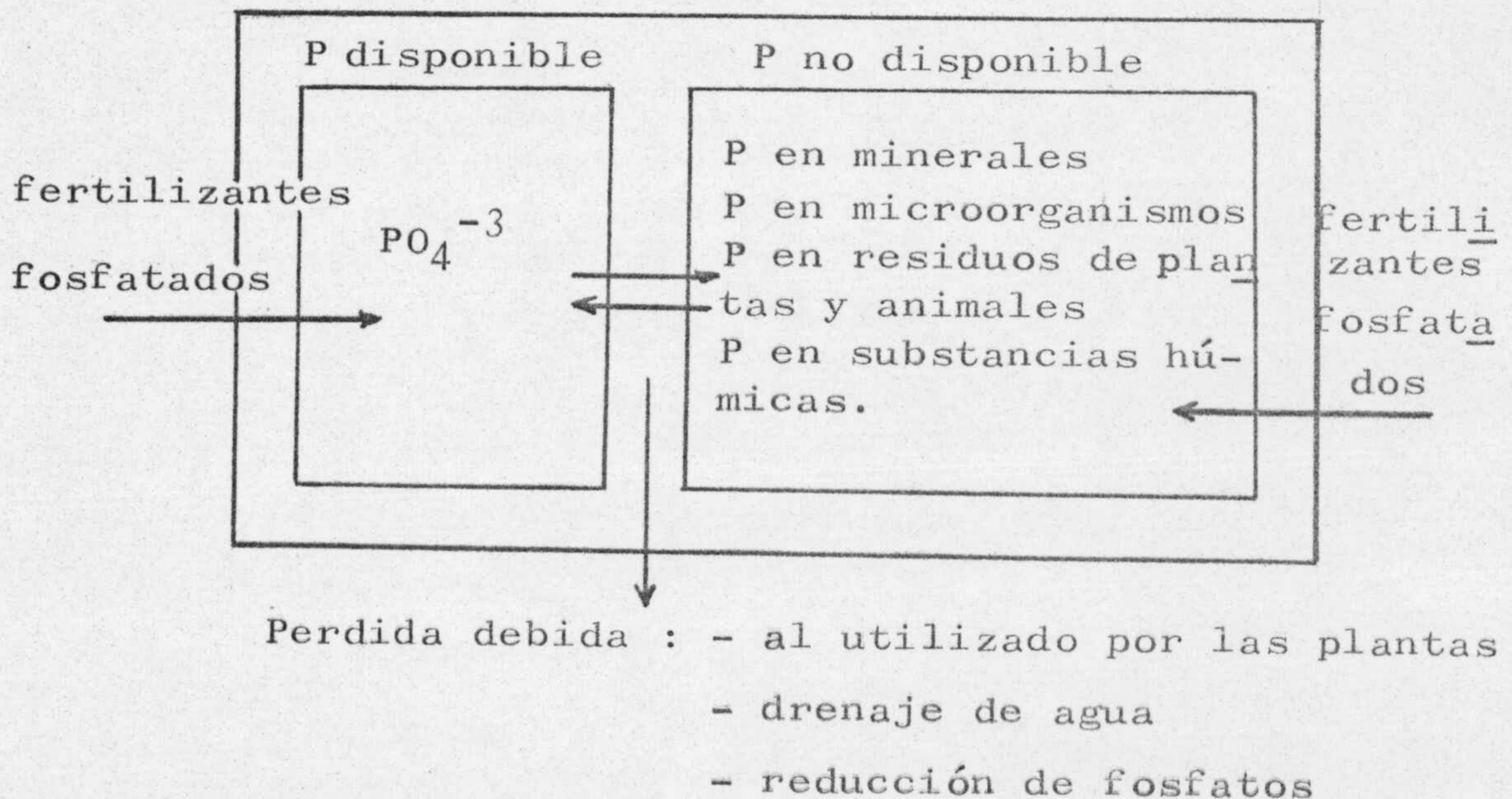
todo de FOSTER, LALLY y WOODRUFF (1949), se utilizan - cilindros calibrados, mientras que BONNET (1966) em -- plea discos de papel. En ambos casos los cálculos se realizan siguiendo el procedimiento de la curva patrón.

De lo anteriormente expuesto se concluye la existencia de una diversidad de métodos para la valora ción de vitaminas. Ello es debido principalmente a que no existe método de análisis que sea aplicable satis - factoriamente a todos los tipos de muestra. La elección viene condicionada por las propiedades y composición - del material objeto de estudio.

7.- Solubilización de fósforo por las bacterias del suelo.

El P, elemento esencial para la célula, forma parte de la materia orgánica e interviene en los procesos de captación, almacenamiento y transferencia de energía.

El pool de fósforo en el suelo, esquematizado por HATTORI (1973) es el siguiente:



La nutrición fosforada de los vegetales depende exclusivamente de los iones fosfatos presentes en la solución del suelo, los cuales provienen:

1.- De la disolución de las formas minerales insolubles

(a).- fósforo adsorbido por coloides y arcillas

(b).- fósforo de minerales fosfatados tricálcicos, apatito, etc.

2.- De la mineralización de formas orgánicas. La fracción orgánica representa de un 20 a un 80 % del P total en las formas de fitina, ácidos nucleicos y fosfolípidos.

El fósforo inorgánico se encuentra en el suelo en numerosos compuestos de solubilidad variable y en consecuencia mas o menos aprovechable por la planta. Las cantidades de P absorbido bajo la forma orgánica por la planta es probablemente débil e inapreciable y contribuye a la nutrición vegetal, solamente despues de la mineralización.

Existen numerosas pruebas de que los microorganismos son capaces de liberar P mineral de compuestos orgánicos y de solubilizar el P de compuestos inorgánicos insolubles.

ESTERMAN y MC LAREN (1961), atribuyen actividad fosfatásica a la raiz, aunque admiten la fundamental cooperación de los microorganismos del suelo para incrementar la movilización de fosfatos, HANNAPEL , FULLER y FOX (1964).

Desde que GUERRETSSEN (1948) puso de manifiesto el origen biológico de la solubilización de fosfatos insolubles, se han realizado numerosos estudios sobre la abundancia de bacterias solubilizadoras de fosfatos en suelos y en la rizósfera, NOWOTNY y col. (1956), ROVIRA (1965), PAUL y SUNDARA RAO (1971), BAJPAI y RAO (1971 b), algunos de ellos con el fin de utilizarlos como fertilizantes biológicos, SUNDARA RAO , BAJPAI y col. (1963), AZCON, BAREA y CALLAO (1973).

Un gran número de autores han prestado atención al esclarecimiento de los mecanismos por los que actúan tales microorganismos . Así los trabajos de --STOKLASA (1909), MEYER (1944) y TARDIEU-ROCHE (1966) , pusieron de manifiesto la actuación del CO_2 resultante de procesos de oxidación biológica en la solubilización de fosfatos.

Las bacterias quimioautótrofas nitrificantes y las del ciclo del S, producen ácidos minerales fuertes (nítrico y sulfúrico) en el curso de su metabolismo oxidativo, que puede contribuir localmente a la disolución de fosfatos insolubles , ALEXANDER (1967) y HARRISON y col. (1972).

Otro mecanismo sería el debido a bacterias - que liberan H_2S , el cual puede reaccionar con el fosfato férrico para dar sulfuro de Fe y fosfato soluble , SPERBER (1967).

En medios ácidos los fosfatos de Fe y Al son solubilizados por los ácidos que secuestran estas cationes ; el ácido más activo desde este punto de vista es el ácido cítrico, seguido del succínico, málico, oxálico, tartárico y láctico, DOMERGUES y MANGENOT (1970).

NESTENOVA (1958) ha constatado que en el curso de la descomposición del fosfato bicálcico por cultivos de Pseudomonas calcis, se produce oxálico, glucónico, propiónico y acético. BAJPAI y RAO (1971 a) determinan la producción de ácido cítrico y láctico como resultado de la descomposición de la glucosa.

AGNIHOTRI (1970), encuentra que hay una relación directa entre el descenso de pH debido a la producción de ácidos y la solubilización de fosfatos. No obstante en su trabajo recoge la opinión de ciertos autores que dan más importancia a la calidad que a la cantidad de los ácidos orgánicos liberados.

DUFF, WEBLEY y SCOTT (1963), indican que la mayoría de las bacterias solubilizadoras son capaces de producir ácido 2-cetoglucónico y LOUW (1970) da cifras de un 72.73 % que correspondieron en su mayoría a bacilos Gram negativos no esporulados. Este ácido forma un quelato bastante estable con metales divalentes. El número de bacterias que producen ácido 2-cetoglucónico, esta en relación con la riqueza del medio en ---

substancia orgánica y esta aumentado en la rizósfera. DUFF, WEBLEY y SCOTT (1963) y DUFF y WEBLEY (1959).

Los microorganismos responsables de la solubilización de fosfatos pertenecen a grupos diversos y son relativamente abundantes en el suelo, RAGHU y MACRAE (1966), ALEXANDER (1971). Pertenecen a los géneros Alcaligenes, Agrobacterium, Escherichia, Erwinia, Bacillus, Artrobacter, Brevibacterium, Pseudomonas, etc TARDIEUX-ROCHE (1966), así como también se encuentran en actinomicetos y hongos, CHHONKAR y SUBBA RAO (1967), RAMOS y col (1968), KONING (1968), AGNIHOTRI (1970) y MEHTA y BHRIDE (1970).

De los trabajos de GREAVES y WEBLEY (1965), LOUW (1970) y MAHNOUD y col (1973) se concluye que el número de microorganismos solubilizadores es mayor en la rizósfera. De este hecho parece desprenderse un indudable efecto beneficioso sobre la nutrición de las plantas.

KUDZIN y IAROSHEVITCH (1961), han constatado que en las muestras de suelos inoculadas por Bacillus megaterium var phospholyticum un aumento en la cantidad de P aprovechable de 9.7 a 18.9 %, así como también una mayor asimilación de P por las plantas en un suelo privado de P inorgánico. TOMASHERSKAI y MANSON (1961), -- han observado en suelos inoculados por un complejo de la microflora rizosférica de diversas plantas una li--

beración de P en presencia de sacarosa y a partir de fosforita.

III MATERIAL Y METODOS

III.- MATERIAL Y METODOS

1.- Microorganismos utilizados

1.1.- En la investigación de vitaminas

- 138 bacterias aisladas de suelos de la estación experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona y de suelos de Alicante (RUIZ-BERRAQUERO, 1974).

- 327 bacterias aisladas de la Rizosfera de Diplotaxis muralis, Antemis nobilis, Triticum vulgare, Viola tricolor, Poa vivipara, Gallium aparine.

- 314 bacterias aisladas de la Rizoplana de Diplotaxis muralis, Antemis nobilis, Triticum vulgare, Viola tricolor, Poa vivipara, Gallium aparine.

1.2.- Cepas auxotróficas

- Leuconostoc mesenteroides ATCC 8042 para vitaminas B₁₂, Pantenol y Biotina.

- Lactobacillus fermentium ATCC 9338 para niacina y-riboflavina.

2.- Toma de muestras

Se han tomada muestras de 3 zonas diferentes

2.1. Zona cercana a la rizosfera

Se recogio a una profundidad de 10 cm, mediante punzón de hierro. La muestra se introdujo en una placa de Petri estéril.

2.2.- Rizosfera

La planta fue cuidadosamente removida del suelo para no romper el sistema radicular. Se cortó la parte superior de la planta y la raiz se agitó vigorosamente para desprender la tierra adherida.

2.3.- Rizoplana

Se lavó la raiz repetidas veces con agua destilada y se introdujo dentro de un matraz sovirel que contenia 100 ml de solución acuosa esteril de pirofosfato al 1/oo.

3.- Aislamiento de bacterias

3.1.- Zona cercana a la rizosfera

Se utilizó la técnica de diluciones seriadas de la muestra en una solución de pirofosfato al 1 por mil, en agua destilada. Como se sabe, el pirofosfato ayuda a la dispersión de las partículas del suelo.

Se suspendió 1g. de suelo en un tubo que contenga 10 ml de la solución anteriormente citada y se agita fuertemente en un Whirlimixer Fisons. 1 ml de esta dilución se suspende en un tubo que contenga 9 ml de solución de pirofosfato y así se continúa hasta la dilución 10^{-5} .

Utilizando las tres últimas diluciones, se realizan siembras de 0,1ml por placa, en series de 3 placas por dilución. Estas placas se incuban a 28°C.

3.2.- Aislamiento de bacterias de la rizosfera

Se introduce la raíz que se ha agitado vigorosamente para así desprender toda la tierra adherida y se introduce en un matraz sovirel que contiene 100 ml de solución de pirofosfato al 1/100, se agita en un Whirlimixer durante 3 minutos. Se realizan diluciones seriadas al 1/10. Se siembran 0,1 ml en cada placa a razón de 3 placas por dilución. Previa incubación a 28°C se eligen aquellas placas que contengan entre 30 y 50

colonias. Todas las colonias fueron aisladas y conservadas en agar nutritivo.

3.3.- Aislamiento de bacterias de la rizoplana

Se introduce la raiz lavada previamente con agua destilada esteril en un matraz que contiene solución de pirofosfato al 1/100. Se agita en un Whirlimiler durante 3 minutos. Se realizan diluciones seriadas al 1/10. Se siembran 0,1 ml en cada placa a razón de 3 placas por dilución.

Previa incubación a 28°C se eligen aquellas placas que contengan entre 30 y 50 colonias. Todas las colonias fueron aisladas y conservadas en agar nutritivo.

3.4.- Aislamiento de solubilizadores

El medio de cultivo utilizado es el descrito por RAMOS y CALLAO (1967). Es un medio empobrecido al que se añade como fuente de fosfato, fosfato bicálcico insoluble. La composición es la siguiente:

Glucosa	20 g.
Cloruro amónico	7 g.
Sulfato magnésico	0,5g.
Fosfato bicálcico	2 g.
Agar purificado	18 g.

Se ajusta el pH a 7.5 y se esteriliza a 115°C durante 20 minutos. Al repartir hay que agitar constantemente el medio, con objeto de que el fosfato bicalcico no se deposite en el fondo.

En el medio anteriormente descrito, las bacterias solubilizadoras presentan un halo transparente, visible al contrastar con la opacidad del medio. Estas colonias se aislan y se conservan en agar nutritivo.

3.5.- Aislamiento de no solubilizadores

Las colonias que se han dado como negativas en el primer aislamiento, se siembran en el medio para solubilizadores de fosfatos, considerando como negativas aquellas que no presentan halo de solubilización a los 10 días.

4.- Técnica de revelado en placa

Es una modificación de la descrita para determinar la producción de ácido glutámico por UDAKA (1960) y CLOTTET, GUINEA y PARES-FARRAS (1968), que se basa a su vez en el método de valoración de aminoácidos por procedimientos microbiológicos de STELL (1949).

Se emplean cepas auxotróficas para la vitamina que se quiere investigar conservadas en medio MRS - (MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960).

Se inoculan con esta cepa 6 ml de un medio de revelado que posee todos los nutrientes necesarios para su crecimiento a excepción de la vitamina que se investiga.

Se mezcló suavemente con una cantidad equivalente de agar fundido en Ringer 1/4 a 55°C y se vierte rápidamente sobre la placa en la cual ha crecido previamente la bacteria problema.

El microorganismo auxotrófico solo crecerá si la bacteria problema produce la vitamina de la cual carece el medio de ensayo. Si la bacteria problema es capaz de liberar la vitamina en el medio de cultivo, la cepa auxotrófica crece alrededor de ella.

El halo formado depende tanto en tamaño como en concentración de las microcolonias, de la cantidad de vitamina liberada por la estirpe ensayada.

5.- Medio base para revelado

Es un medio empobrecido al que se añade como fuente de fósforo fosfato monopotásico.

La composición es la siguiente:

Glucosa	20 g.
Cloruro amónico	7 g.
Sulfato magnesico	0,5 g.
Fosfato monopotásico	2 g.
Agar purificado	18 g.

Agua destilada 1.000 ml.

Se ajusta el pH a 7.5 y se esteriliza a 115°C durante 20 minutos.

6.- Siembra de la bacteria problema

Las bacterias anteriormente aisladas y conservadas en agar nutritivo, fueron sembradas masivamente en un punto de la placa. Cada placa se utilizó para cinco bacterias, cuatro dispuestas circularmente y una en el centro.

Las placas se llevan a la estufa a 28°C, efectuandose la prueba del revelado a las 24 horas.

Todas las bacterias fueron investigadas en condiciones similares. Se observó que el tamaño del halo no varía con el transcurso del tiempo.

7.- Medio de conservación de las cepas auxotróficas

El medio de conservación de las células auxotróficas es MRS Oxoid (MAN, ROGOSA, SHARPE 1960).

Peptona	10 g.
"Lab-lemco" L29 (polvo)	8 g.
Extracto de levadura	4 g.
Dextrosa	20 g.
Tween 80	1 ml

Fosfato monoácido de K	2 g.
Acetato de sodio x 3H ₂ O	5 g.
Citrato tri-amónico	2 g.
Sulfato de Mg x 7H ₂ O	0,2g.
Sulfato de Mg x 4H ₂ O	0,05g.
Agar nº 1	10 g.

Se suspenden 62 g. en 1000 ml de agua destilada y se funde. Se reparte en tubos y se esteriliza a 1 atmosfera durante 15 minutos.

8.- Obtención del inóculo

24 horas antes de proceder al revelado, se siembra la cepa auxotrófica en un tubo con medio MRS inclinado.

9.- Medios de revelado

Como medios de revelado utilizamos los "bacto assay medium" para las diferentes vitaminas.

- Bacto B₁₂ assay medium USP (Difco)
- Bacto Rivoftavin assay medium (Difco)
- Bacto Niacin assay medium (Difco)
- Bacto panthenol assay medium (Difco)
- Bacto biotin assay medium (Difco)

Estos medios tienen composición mas o menos semejante conteniendo todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de la cepa auxotrófica a excepción de la vitamina que queremos investigar.

Daremos la composición de bacto B₁₂ "assay-medium" USP (Difco supplementary literature 1966) como ejemplo:

Bacto vitamina libre de casaminoácidos	15 g.
Bacto dextrosa	40 g.
Bacto asparagina	0,2 g.
Acetato de sodio	20 g.
Acido ascórbico	4 g.
L cistina	0,4 g.
DL triptofano	0,4 g.
Sulfato de adenina	20 mg.
Cloridrato de guanina	20 mg.
Uracilo	20 mg.
Xantina	20 mg.
Riboflavina	1 mg.
Cloridrato de tiamina	1 mg.
Biotina	10 mg.
Niacina	2 mg.
Acido para-aminobenzoico	2 mg.
Pantotenato de calcio	1 mg.
Cloridrato de piridoxina	4 mg.
Cloridrato de piridoxal:	4 mg.
Cloridrato de piridoxamina	800 mcg

Acido fólico	200 mcg.
Fosfato monopotásico	1 g.
Fosfato dipotásico	1 g.
Sulfato de magnesio	0,4 g.
Cloruro de sodio	20 mg.
Sulfato ferroso	20 mg.
Sulfato de manganeso	20 mg.
Complejo Sorbitan-monooleato	2 mg.

Se disuelven 8,5 g en 100 ml de agua destilada. Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

10.- Revelado

En un tubo de ensayo que contiene 6 ml del medio de ensayo correspondiente a la vitamina que se desea investigar, se suspende un asa del inóculo (densidad óptica=4). Se añade a la suspensión anterior 6ml de agar Ringer 1/4 con doble concentración de agar a 55°C y se mezcla agitando suavemente para evitar burbujas, se vierte rápidamente sobre la placa, antes de la solidificación. Luego se llevan las placas a la estufa de 35°C.

Este método ha sido posteriormente modificado con el fin de llegar a una mayor rapidez y standardización del mismo.

Se han reemplazado los tubos de ensayo por

matraces Sovirel de 250 ml con tapon de rosca. La metodologia a seguir fué semejante. Se suspende el inóculo en 100 ml del medio de ensayo (Densidad óptica-4) y se mezcla suavemente con 100 ml de agar Ringer a 55°C, se vierte rapidamente sobre 15 o 16 placas, se deja enfriar y se lleva a la estufa.

10.1.- Solución de Ringer

ClNa	8.5 g.
ClK	0.25 g.
Cl ₂ Ca	0.30 g.
CO ₃ HNa	0.20 g.
H ₂ O destilada	1.000 ml.

Se agita hasta disolver totalmente las sales y se utiliza diluída al cuarto.

10.2.- Agar Ringer

Solución Ringer 1/4	100 ml.
Agar purificado (BBL)	3.6 g.

Se funde y se esteriliza a 1 atmósfera, durante 15 minutos.

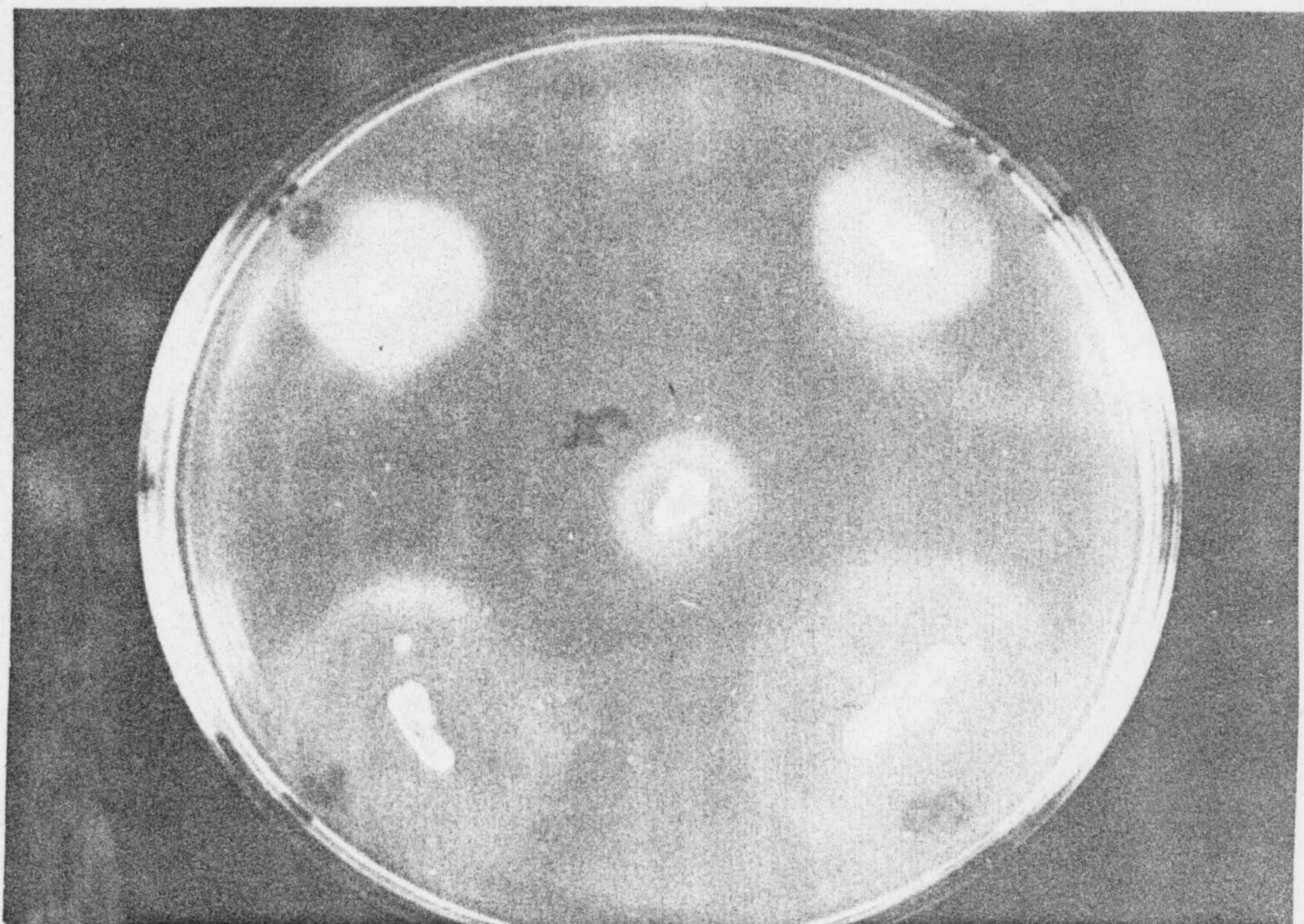


Figura 1 .- Producción de vitaminas por bacterias del suelo. Técnica de revelado en placa. Los 5 microorganismos ensayados resultan productores.

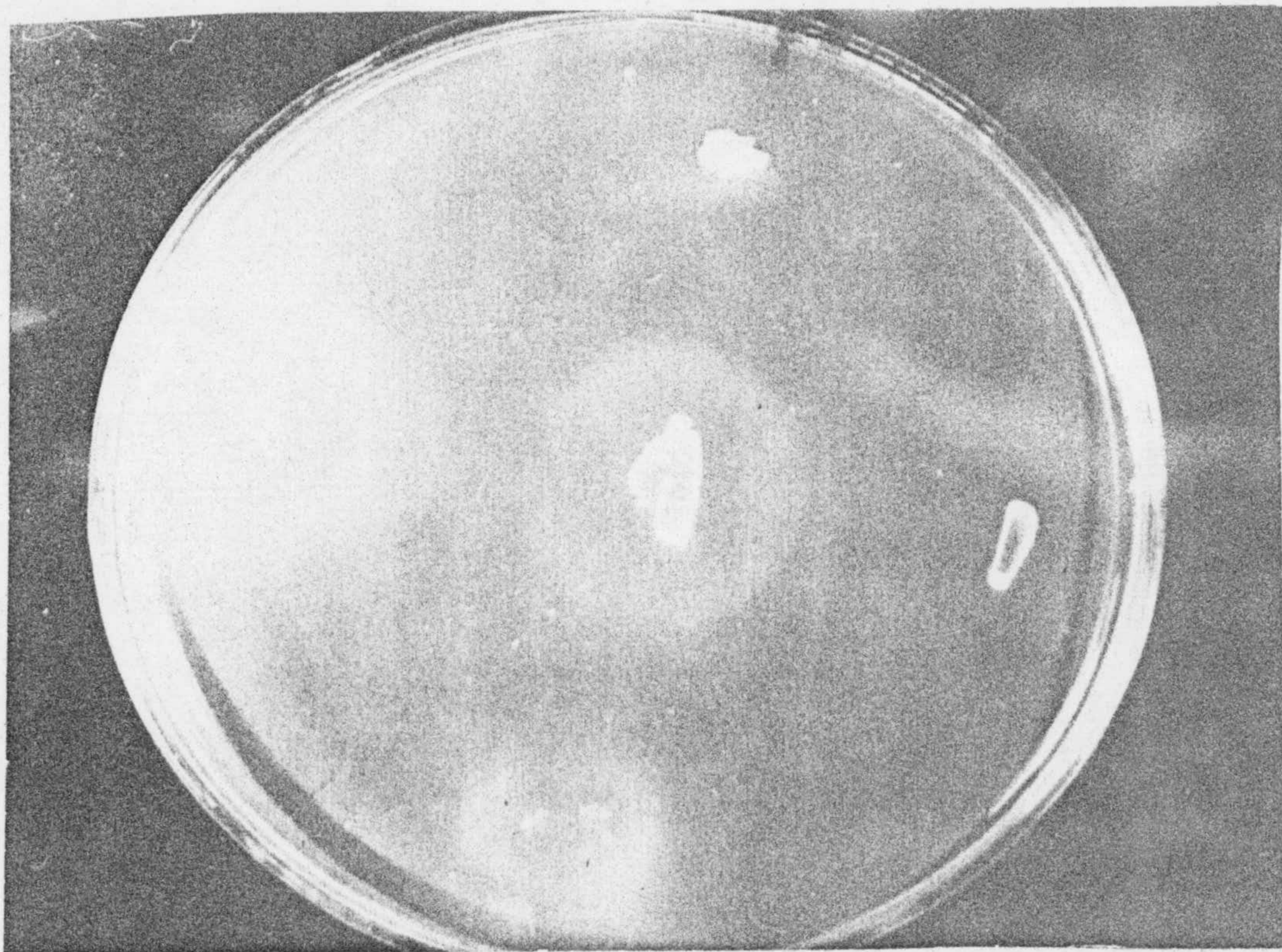


Figura 2 .- Producción de vitaminas por bacterias del suelo. Técnica de revelado en placa. Dos de los 5 microorganismos ensayados dan resultados negativos, siendo los otros tres productores.

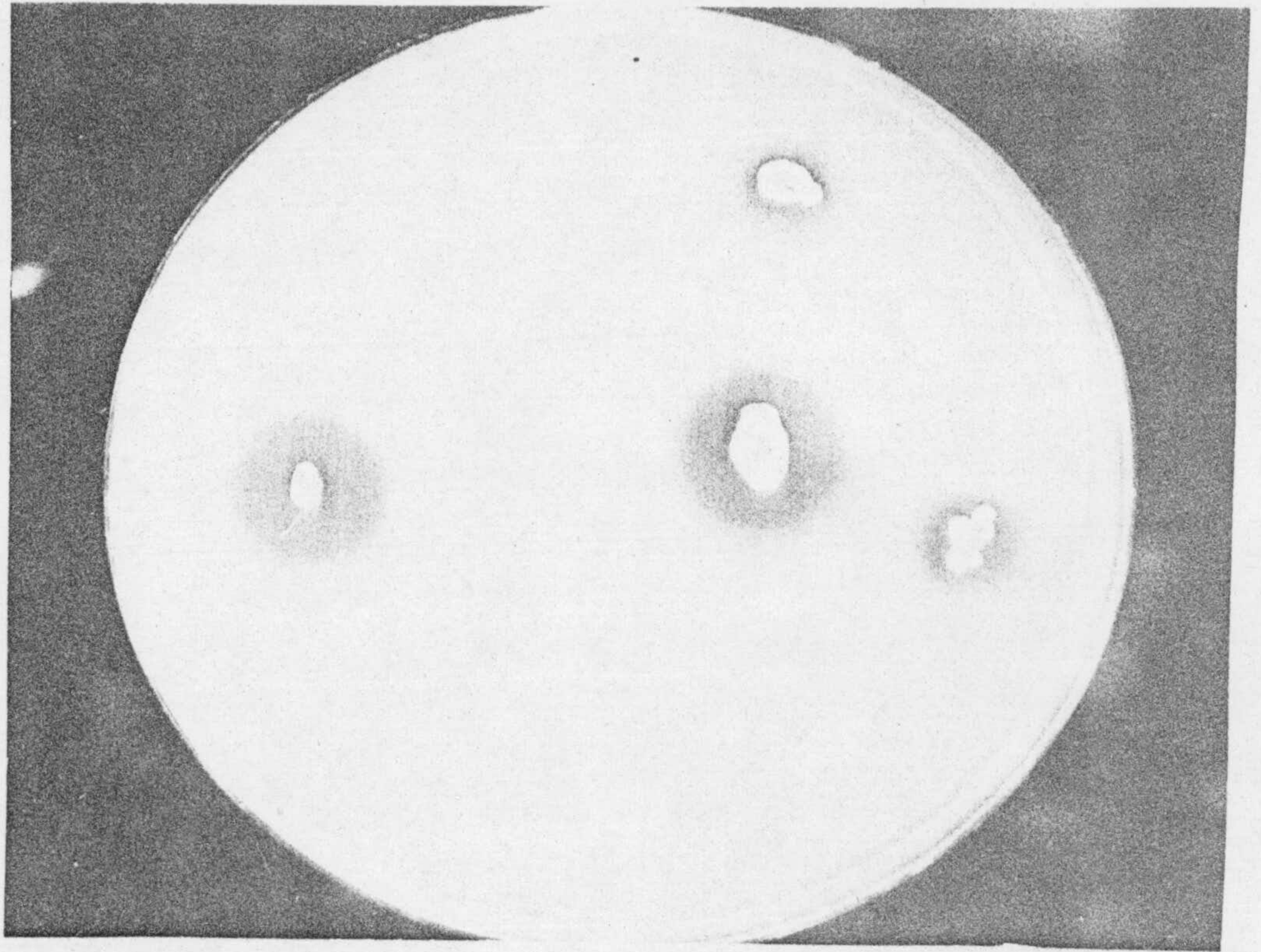


Figura 3. - Comprobación de la capacidad de solubilizar fosfato bicálcico por bacterias aisladas del suelo.

ESQUEMA DE LA TECNICA DE REVELADO

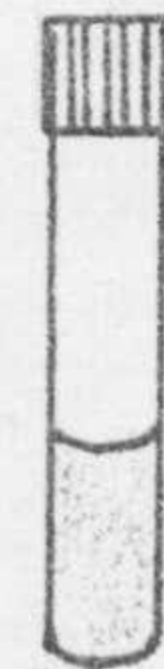
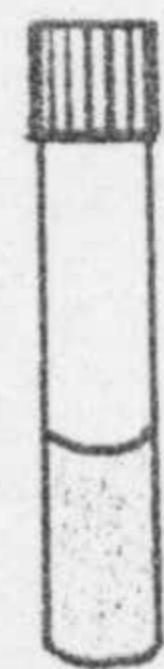
Microorganismo auxotrófico

crecido en medio MRS

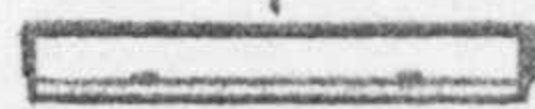
(18 a 24 horas)



6 ml medio ensayo
de vitaminas + mi
croorganismo auxo
trófico (D0=4).



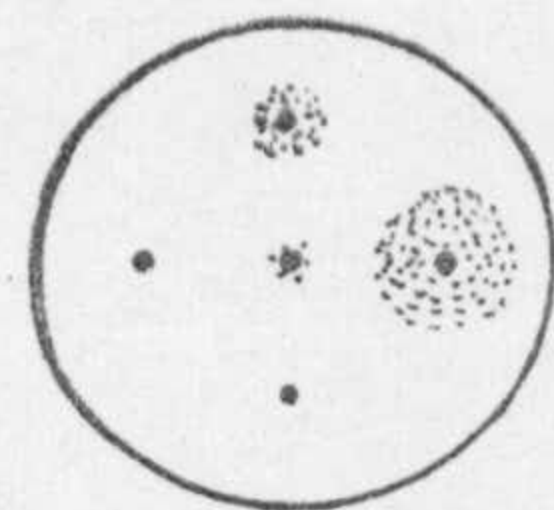
6 ml de medio Ringer
1/4 + agar purifica-
do en csp 12 ml (fun
dido a 45° C)



placa + medio base +
crecimiento bacteriano



placa medio base + me
dio de revelado



halos de crecimiento
del microorganismo au
xotrófico en propor-
ción a la cantidad se
gregada por la bacteria
problema.

11.- Lectura de los resultados

Se han realizado observaciones diarias de las placas, aunque los resultados presentados en este trabajo son de la lectura a las 48 horas.

Los halos de crecimiento se observan fácilmente a simple vista . En los casos de que esta observación fue negativa, se investigo al microscopio la existencia de crecimiento

12.- Criterios de valoración de los halos

En las valoraciones dadas, se han tomado en cuenta tanto el tamaño del halo, como la densidad de las microcolonias.

Se han propuesto los índices de valoración 0, 0M, 1 y 2 de acuerdo con el siguiente criterio:

0 : no se observan microcolonias del testigo (auxótrofo)

0M : crecimiento de la cepa auxotrófica observable solo al microscopio, sobre la colonia y ligeramente alrededor de ella.

1 : halos visibles macroscopicamente de hasta 0.3 cm de densidad de microcolonias variable o bien ha -

los de hasta 0.5 cm de densidad escasa.

2 : halos visibles macroscopicamente de hasta 1.5cm de densidad variable.

13.- Fórmula para el cálculo de los estadígrafos de prueba

Para determinar si la diferencia entre dos porcentajes es significativa al nivel de significación 0.05, es decir con un 95 % de confianza, se recurre al cálculo de N, estadígrafo de prueba que es válido para muestras de distinto tamaño, siempre que este sea elevado. El valor viene dado por la siguiente fórmula:

$$N = \frac{p_1 - p_2}{\frac{p_1(1-p_1)}{n_1} + \frac{p_2(1-p_2)}{n_2}}$$

El valor N calculado, se compara con un punto de significación obtenido de una curva normal tipificada. Para un nivel de significación 0.05 (95 %

de confianza), este punto de significación vale 1.96. Esto supone que serán significativas las diferencias a las que correspondan valores de N superior a 1.96, pero no serán significativas aquellas para las cuales N sea igual o menor a 1.96.

Para 0.05 (95% de confianza)

Si $N > 1.96$ la diferencia se considera significativa

Si $N \leq 1.96$ la diferencia se considera como no - significativa

IV RESULTADOS

IV.-1.- ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA: Producción de vi
taminas, solubilización, características de Gram y
morfología de los microorganismos ensayados.

Tabla 1.- en las 9 páginas siguientes se exponen los resultados obtenidos sobre producción de vitaminas por microorganismos aislados de la zona cercana a la rizosfera. Se señala el comportamiento frente a la tinción de Gram, su morfología (c= cocos, cb= co cobacilos; bc= bacilos cortos; y b= bacilos). Se incluye además la propiedad de estos microorganismos para solubilizar fosfato bicalcico, en placa designándose como colonia positiva aquella que presenta un halo de solubilización y como negativa la que no lo presenta. Por último se reseñan los datos obtenidos acerca de la producción de vitaminas del grupo ^B.B₁₂ = vitamina B₁₂; P= pantenol; N= niacina; R= riboflavina y B= biotina. Los criterios que hemos utilizado en su valoración 0= negativa; OM= positiva al microscopio; 1 halo de hasta 0,5 cm y 2 halos de 0,6 o mas cm.

Tabla 1.

Nº	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
				B ₁₂	P	N	R	B
B-4	-	c	+	2	1	1	1	OM
C-40	-	bc	+	1	1	OM	1	1
C-42	-	cb	1	1	2	1	0	2
C-44	-	c	+	1	OM	1	0	OM
S-39	-	bc	+	2	2	1	1	2
S-43	-	cb	+	2	2	2	2	2
A-61	-	bc	+	OM	OM	OM	1	OM
B-19	-	cb	+	1	OM	OM	1	1
B-34	-	bc	+	1	OM	OM	1	OM
B-39	-	bc	+	2	1	1	1	1
B-46	-	bc	+	1	0	1	2	1
N-10	-	bc	+	1	1	1	1	1
S-34	-	bc	+	2	2	2	1	2
74	-	cb	+	2	2	2	1	1
B-1	-	bc	+	2	OM	OM	1	OM
B-33	-	bc	+	1	1	1	2	1
B-44	-	bc	+	1	1	1	2	OM

Tabla 1.- (continuación)

Nº	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
				B ₁₂	P	N	R	B
J-21	-	bc	+	1	1	1	2	OM
S-75	-	cb	+	2	1	1	1	OM
S-76	-	bc	+	OM	OM	1	1	OM
A-10	-	cb	-	1	1	1	1	OM
A-21	-	cb	-	2	2	2	1	OM
A-85	-	c	-	2	2	1	0	1
A-92	-	cb	-	2	1	2	2	1
B-20	-	b	-	1	1	OM	1	OM
P	-	bc	-	2	1	1	2	1
S-25	-	bc	-	1	1	1	0	0
S-55	-	c	-	OM	OM	OM	0	OM
41	-	bc	-	1	1	1	1	1
A-71	-	b	-	1	1	1	1	1
B-38	-	cb	-	2	2	1	1	1
S-804	-	bc	-	1	1	1	2	OM
C-51	-	bc	+	2	1	1	1	2

Tabla 1.- (continuación)

Nº	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
				B ₁₂	P	N	R	B
J-2	-	cb	+	2	1	2	2	OM
S-d	-	cb	+	2	1	2	2	1
S-31	-	bc	+	1	1	1	1	1
S-902	-	bc	+	2	1	1	1	0
52	-	bc	+	0	2	2	0	1
A-3	-	bc	+	2	2	1	1	1
A-44	-	cb	+	1	1	1	1	1
A-50	-	cb	+	2	2	1	1	1
A-53	-	bc	+	2	2	1	1	OM
A-65	-	bc	+	2	2	1	1	1
A-78	-	cb	+	1	1	1	1	1
A-95	-	bc	+	0	1	0	0	1
B-49	-	bc	+	2	2	1	1	1
C-36	-	bc	+	1	2	1	0	1
J-1	-	bc	+	2	2	1	2	OM
J-22	-	cb	+	1	2	1	2	OM

Tabla 1.- (continuación)

Nº	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
				B ₁₂	P	N	R	B
S-1	-	bc	+	2	1	2	1	1
S-20	-	bc	+	2	2	2	1	2
S-23	-	bc	+	2	2	2	2	2
S-27	-	bc	+	2	1	2	2	1
S-28	-	bc	+	2	1	2	2	2
S-29	-	bc	+	2	OM	OM	1	0
S-33	-	bc	+	2	2	2	2	1
S-37	-	bc	+	2	1	1	1	1
S-46	-	bc	+	2	2	2	2	2
S-92	-	bc	+	2	2	2	2	2
S-95	-	bc	+	1	OM	OM	OM	OM
A-13	-	cb	+	2	1	1	1	1
A-45	-	cb	+	2	2	1	1	1
A-51	-	b	+	2	2	1	1	1
A-72	-	b	+	2	1	1	1	1
A-74	-	cb	+	2	2	2	1	1

Tabla 1.- (continuación)

Nº	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
				B ₁₂	P	N	R	B
A-93	-	cb	+	2	1	1	1	2
A-97	+	cb	+	1	0	2	0	1
A-14	+	b	+	2	2	1	1	OM
A-15	+	b	+	OM	1	0	1	1
A-90	+	b	+	2	1	2	1	OM
A-94	+	b	+	2	2	2	2	1
B-14	+	cb	+	1	1	0	0	OM
N-4	+	cb	+	1	1	OM	1	0
Sa	+	b	+	2	1	2	1	1
Sb	+	b	+	2	1	1	1	1
1	+	b	+	2	2	2	1	OM
2	+	b	+	0	1	0	1	1
2	+	b	+	2	OM	1	0	OM
4	+	b	+	0	1	OM	1	1
5	+	b	+	2	2	2	1	1
7	+	b	+	1	OM	OM	1	1

Tabla 1.- (continuación)

Nº	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
				B ₁₂	P	N	R	B
10	+	b	+	2	2	1	1	1
11	+	b	+	0	1	0	1	1
12	+	b	+	2	2	1	2	OM
31	+	b	+	2	2	2	1	0
79	+	b	+	1	1	0	1	1
80	+	b	+	2	2	2	1	1
81	+	b	+	2	OM	1	1	1
83	+	b	+	1	2	0	1	1
A-16	+	cb	+	1	1	1	0	1
A-24	+	cb	+	2	2	0	2	OM
N-7	+	b	+	OM	OM	2	1	OM
N-8	+	b	+	OM	OM	2	2	OM
R-2	+	b	+	2	1	OM	0	OM
J-30	+	b	+	OM	1	1	2	OM
N-1	+	b	+	OM	OM	2	2	OM
N-2	+	b	+	OM	OM	OM	1	1

Tabla 1.- (continuación)

Nº	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
				B ₁₂	P	N	R	B
S-50	+	bc	+	OM	OM	OM	1	OM
S-57	+	c	+	OM	OM	OM	1	OM
S-58	+	cb	+	2	OM	1	1	OM
S-74	+	bc	+	1	2	2	1	1
S-82	+	b	+	1	OM	OM	1	OM
S-702	+	cb	+	1	1	2	1	OM
S-703	+	b	+	2	2	2	1	1
6	+	cb	+	0	OM	OM	0	OM
18	+	b	+	2	2	1	2	OM
A-1	+	b	-	2	1	1	2	1
A-25	+	b	-	2	2	1	0	OM
A-40	+	b	-	2	2	1	1	1
A-62	+	cb	-	2	1	1	0	OM
A-84	+	cb	-	1	2	1	0	1
C-76	+	b	-	2	OM	2	2	OM
N-3	+	b	-	1	OM	0	1	0

Tabla 1.- (continuación)

Nº	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
				B ₁₂	P	N	R	B
S-21	+	c	-	1	OM	1	2	OM
S-22	+	b	-	OM	0	OM	1	OM
S-24	+	cb	-	1	1	1	1	1
S-51	+	b	-	2	1	OM	OM	1
S-54	+	b	-	OM	OM	OM	OM	OM
S-72	+	bc	-	2	OM	1	1	1
S-901	+	c	-	2	1	2	2	1
13	+	b	-	2	0	1	2	1
20	+	b	-	2	2	2	1	1
39	+	c	-	2	2	1	1	OM
42	+	c	-	2	2	2	0	1
A-43	+	cb		1	2	1	1	1
A-49	+	b		2	2	1	1	OM
A-73	+	b		2	2	1	1	1
B-6	+	b		OM	1	2	1	OM
B-54	+	b		2	2	0	0	1
B-84	+	b		2	2	1	0	1

Tabla 1.- (continuación)

Nº	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
				B ₁₂	P	N	R	B
75	+	c		2	2	1	1	1
S-803	v	bc	+	1	0	1	0	OM
N-5	v	b	+	OM	OM	OM	1	OM
R-3	v	cb	+	1	0	0	0	OM
S-73	v	bc	+	2	1	1	OM	OM
S-98	v	b	-	1	1	2	2	1
S-17	v	t	-	2	1	2	2	1
S-801	v	cb		1	1	1	2	OM

IV.- 2.- RIZOSFERA. Producción de vitaminas. Solubili-
zación y características de Gram y morfología de los mi
croorganismos ensayados.

Tabla 2.- en las 15 páginas siguientes se exponen los resultados obtenidos sobre producción - de vitaminas por microorganismos aislados de la rizosfera . Se señala el número de bacterias (n), el comportamiento frente a la tinción de Gram, su morfología (c= cocos, cb= cocobacilos; bc= bacilos cortos y b= bacilos). Se incluye además la propiedad de estos microorganismos para solubilizar fosfato bicálcico, en placa designándose como colonia positiva - aquella que presenta un halo de solubilización y como negativa la que no lo presenta. Por último se reseñan los datos obtenidos acerca de la producción - de vitaminas del grupo ^B. B₁₂ = vitamina B₁₂; P= pan- tenol; N= niacina; R= riboflavina y B= biotina. Los criterios que hemos utilizado en su valoración 0=ne- gativa; OM= positiva al microscopio; 1 halo de has- ta 0,5 cm y 2 halos de 0,6 o mas cm.

Tabla 2.-

PRODUCCION DE VITAMINAS

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	B ₁₂	P	N	R	B
G-1	1	-	b	-	1	1	1	1	1
G-2	-	+	cb	-	0	OM	1	1	0
G-3	1	+	cb	-	OM	1	1	1	OM
G-4	1	-	cb	+	2	0	1	1	1
G-5	1	+	b	-	2	0	1	1	1
G-6	1	-	cb	-	2	1	1	2	1
G-7	1	-	b	-	2	1	1	0	1
G-8	1	+	b	-	2	1	1	1	1
G-9	1	-	cb	+	2	2	1	1	1
G-10	1	-	cb	-	2	1	1	1	1
G-11	1	-	cb	+	2	1	2	2	2
G-12	1	+	c	-	2	2	1	1	1
G-1	1	+	cb	-	OM	1	1	1	OM
G-14	1	-	cb	+	2	2	1	1	2
G-15	1	+	cb	-	2	2	1	1	1
G-16	1	+	b	-	2	1	1	1	2
G-17	1	-	c	-	1	1	1	OM	OM

Tabla 2.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
G-18	1	-	b	-	1	OM	1	2	OM
G-19	1	-	b	-	2	1	1	1	1
G-20	1	-	cb	+	2	2	1	1	1
G-21	1	-	cb	-	2	2	1	1	1
G-22	1	-	bc	+	2	1	1	2	1
G-23	1	-	cb	+	2	2	1	1	2
G-24	1	-	cb	-	2	1	1	1	1
G-25	1	+	c	-	1	1	1	1	1
G-26	1	-	cb	+	2	1	1	1	1
G-27	1	+	cb	-	0	1	1	2	OM
G-28	1	-	cb	-	OM	1	1	1	OM
G-29	1	+	cb	-	0	1	1	1	OM
G-30	1	-	c	+	2	1	OM	1	1
G-31	1	+	cb	-	0	0	OM	OM	OM
G-32	1	+	cb	-	1	1	2	1	OM
G-33	1	-	cb	+	2	2	1	2	2
G-34	1	-	cb	-	2	2	1	2	2
G-35	1	-	cb	+	2	2	1	2	2

Tabla 2.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
G-36	1	-	c	+	2	2	1	1	2
G-37	1	+	b	-	1	1	1	OM	OM
G-38	1	-	c	+	2	2	1	1	1
G-39	1	+	cb	-	OM	OM	OM	1	OM
G-40	1	-	cb	+	2	2	1	1	1
G-41	1	+	c	-	1	1	1	OM	1
G-42	1	-	bc	-	OM	OM	1	1	OM
G-43	1	-	cb	-	OM	1	1	1	OM
G-44	1	-	bc	+	2	1	1	1	2
G-45	1	-	cb	+	2	1	2	1	1
G-46	1	-	bc	-	1	0	1	1	1
G-47	1	-	cb	-	1	OM	OM	1	1
G-48	1	-	cb	+	2	2	2	1	1
G-49	1	-	bc	-	2	1	1	1	1
G-50	1	-	bc	+	2	1	1	2	2
G-51	1	+	cb	-	OM	1	1	OM	OM
G-52	1	+	b	-	2	2	1	1	2

Tabla 2.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
G-53	1	-	cb	+	2	1	1	2	1
G-54	1	+	b	-	1	OM	1	1	OM
G-55	1	+	bc	-	1	1	1	1	OM
G-56	1	+	cb	-	0	OM	OM	OM	1
L-1	1	-	cb	-	1	1	2	1	1
L-2	1	+	bc	-	2	2	1	1	1
L-3	1	-	c	+	2	2	1	1	1
L-4	1	-	bc	-	2	2	2	1	2
L-5	1	-	bc	-	OM	1	2	1	1
L-6	1	-	bc	-	2	2	2	1	2
L-7	1	-	cb	-	1	1	1	OM	1
L-8	1	+	cb	-	2	2	2	1	2
L-9	1	+	cb	-	2	2	2	1	1
L-10	1	-	bc	-	2	1	1	1	1
L-11	1	-	b	-	2	2	1	1	1
L-12	1	+	b	-	1	1	2	1	1
L-13	1	-	c	-	2	2	1	1	1

Tabla 2.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
L-14	1	-	cb	-	2	2	1	1	1
L-15	1	-	b	-	1	1	OM	OM	OM
L-16	1	+	bc	-	2	2	1	1	1
L-17	1	-	c	-	2	2	1	1	1
L-18	1	-	b	-	2	1	OM	0	OM
L-19	1	-	c	-	2	2	1	1	1
L-20	1	+	cb	-	1	1	1	1	1
L-21	1	-	c	-	2	2	1	1	1
L-22	1	-	cb	-	2	2	1	1	1
L-23	1	-	bc	-	1	1	1	OM	OM
L-24	1	-	bc	-	2	1	OM	OM	OM
L-25	1	-	bc	-	2	2	1	1	1
L-26	1	-	bc	-	OM	OM	OM	OM	OM
L-27	1	-	bc	-	2	2	1	OM	1
L-28	1	+	bc	-	1	1	2	OM	1
L-29	1	-	bc	-	2	1	1	OM	1
L-30	1	+	cb	-	2	2	2	OM	1

Tabla 2.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
L-64	1	-	b	-	2	2	1	1	2
L-65	1	-	cb	-	2	2	1	1	2
L-66	1	-	b	-	1	2	1	1	1
L-67	1	-	b	-	1	2	2	1	1
L-68	1	-	cb	+	2	1	0	2	OM
L-69	1	+	b	-	1	1	1	1	1
L-70	1	+	cb	-	2	2	1	1	1
L-71	1	-	bc	-	1	2	1	OM	OM
L-72	1	-	b	-	2	1	1	1	1
L-73	1	+	cb	-	1	OM	OM	0	OM
L-74	1	-	bc	-	1	1	OM	1	OM
L-75	1	+	cb	-	OM	1	1	1	OM
L-76	1	+	bc	+	1	1	OM	1	OM
L-77	1	+	b	+	2	2	1	1	1
L-78	1	+	b	+	2	2	2	1	1
L-79	1	-	b	-	1	1	1	1	1
L-81	1	-	cb	-	1	1	0	1	1

Tabla 2.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
L-82	1	-	cb	-	1	1	0	1	1
L-83	1	-	cb	+	1	1	0	1	1
L-84	1	+	b	+	1	1	0	1	1
L-85	1	+	cb	-	2	1	1	2	1
L-86	1	-	bc	-	OM	1	OM	1	OM
L-87	1	+	cb	+	1	1	OM	OM	1
L-88	1	+	b	-	OM	0	0	1	1
L-89	1	+	bc	+	2	1	2	2	2
L-90	1	+	c	-	2	1	2	2	2
L-91	1	-	bc	-	1	1	1	1	1
L-92	1	-	bc	-	1	1	1	1	1
L-94	1	-	cb	-	1	1	1	1	1
L-95	1	-	b	-	2	1	1	2	1
L-96	1	+	bc	-	1	1	1	1	1
L-97	1	-	b	-	2	1	1	1	1
L-98	1	-	bc	-	1	1	OM	1	1
L-99	1	+	cb	-	OM	1	1	1	1

Tabla 2,- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
L-100	1	-	bc	-	1	1	1	1	1
L-101	1	-	b	-	1	1	1	1	1
L-102	1	-	bc	+	1	0	0	1	1
L-103	1	-	b	-	1	1	1	1	1
L-104	1	-	b	-	1	1	OM	1	1
L-105	1	+	cb	-	1	1	1	1	1
L-106	1	+	cb	-	OM	1	OM	1	1
L-107	1	-	cb	-	1	1	2	1	1
L-108	1	-	bc	+	1	OM	0	1	2
L-109	1	-	bc	-	1	2	OM	1	2
L-111	1	-	bc	-	1	1	OM	1	1
L-115	1	-	b	-	2	1	1	1	1
L-116	1	-	b	-	2	1	1	1	1
L-117	1	-	bc	+	2	2	1	2	1
L-118	1	+	b	-	OM	1	0	1	1
L-119	1	-	b	-	2	1	1	1	1

Tabla 2.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
L-120	1	-	b	-	1	2	0	1	1
L-123	1	-	b	-	1	1	0	OM	1
N-1	9	-	bc	+	2	1	2	2	1
N-2	7	+	b	-	1	1	1	1	1
N-3	1	-	bc	-	2	1	1	2	1
N-4	28	-	cb	-	2	1	1	2	1
N-5	2	-	bc	+	2	1	1	2	1
N-6	1	+	bc	+	2	1	1	2	1
N-7	1	+	bc	-	1	1	1	1	2
N-8	1	+	b	+	1	1	1	2	1
N-9	1	+	b	-	1	1	1	2	1
N-10	1	+	b	+	2	1	1	2	1
N-11	1	-	b	+	2	1	1	1	1
N-12	1	-	b	-	2	1	1	1	1
N-37	1	-	b	-	2	1	1	1	1
N-38	1	+	b	-	2	1	1	2	1
N-39	1	+	b	-	2	1	1	2	1

Tabla 2.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
N-40	1	+	bc	+	2	1	1	2	2
N-41	1	+	b	-	2	2	1	2	2
N-42	1	-	b	-	1	1	1	2	1
N-43	1	+	bc	+	2	1	1	1	1
N-44	1	+	bc	+	2	2	2	2	2
N-45	1	-	bc	+	2	1	1	2	1
N-46	1	+	cb	-	1	1	2	1	1
N-47	1	+	bc	+	2	1	1	1	2
N-48	4	-	b	-	2	1	1	2	1
N-49	2	-	b	+	2	1	1	2	1
N-50	1	+	b	+	2	1	1	2	1
N-51	19	+	bc	+	2	1	2	2	1
E-1	4	-	b	-	2	1	1	1	2
E-2	2	+	b	-	1	1	1	2	1
E-3	1	+	b	-	1	OM	1	2	1
E-4	1	+	b	+	1	1	1	1	1
E-5	1	+	c	-	1	1	1	1	OM

Tabla 2,- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
E-6	1	-	c	+	2	1	1	2	1
E-7	1	+	c	-	2	1	1	1	1
E-8	1	-	b	-	2	1	2	1	1
E-9	1	-	b	+	2	1	1	1	1
E-10	1	-	b	-	1	1	1	1	1
E-11	2	+	c	-	2	1	0	1	1
E-12	1	-	b	+	2	2	1	1	2
E-13	5	-	b	+	1	1	1	1	1
E-14	1	-	b	+	1	1	1	1	1
E-15	1	-	cb	-	2	1	1	1	0
E-16	1	+	b	+	OM	OM	1	1	OM
E-17	1	+	b	-	2	1	1	1	0
E-18	1	-	b	-	1	OM	1	1	OM
E-29	1	+	b	+	2	1	2	2	1
E-30	1	+	b	+	2	1	2	2	1
E-31	1	+	b	-	1	1	2	1	1
E-32	1	-	c	-	1	1	1	1	OM

Tabla 2.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
E-33	1	+	b	-	OM	OM	1	1	0
E-34	9	+	c	-	1	OM	1	1	OM
E-35	1	+	c	-	1	1	1	1	1
E-36	1	-	cb	+	2	2	OM	1	OM
E-37	2	-	cb	+	2	2	1	2	OM
E-38	2	+	b	-	OM	1	2	2	OM
E-39	1	-	b	+	2	2	1	2	2
E-40	1	+	b	-	2	1	1	2	1
E-54	3	-	cb	+	2	1	2	2	2
E-55	1	+	b	+	1	1	2	2	2
E-56	1	-	b	+	2	1	2	2	1
E-57	1	-	bc	+	2	1	2	2	1
E-58	1	-	bc	-	2	1	2	2	1
E-59	1	-	b	-	2	1	2	2	1
E-60	1	-	b	-	2	1	2	2	1
E-61	4	+	b	-	1	1	1	1	OM
E-62	1	-	b	-	2	1	1	1	1

Tabla 2.- (continuación)

Nº	n Gram		Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
E-63	1	-	b	-	2	2	1	2	1
E-64	2	+	bc	-	2	1	2	2	1
E-65	1	+	bc	-	1	1	2	2	1
E-66	1	+	b	-	OM	1	2	1	OM
E-67	1	+	b	-	1	OM	0	1	OM
E-68	1	+	b	-	1	OM	1	1	OM
E-69	1	+	b	+	OM	OM	1	1	OM
E-70	1	+	b	-	OM	OM	1	1	OM
E-71	1	+	b	+	1	OM	1	1	OM
E-72	1	-	bc	-	2	1	1	1	1
E-77	2	-	b	+	2	2	1	2	1
E-78	1	-	bc	+	2	1	1	OM	1
E-79	1	-	cb	+	2	1	2	2	2
E-80	1	+	b	+	2	1	2	1	2
E-81	5	+	b	+	1	1	1	2	1
E-82	1	+	bc	-	2	1	1	2	1
E-83	1	+	b	-	1	1	1	2	1

Tabla 2.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
E-84	1	+	cb	-	1	1	1	2	2
E-85	1	-	b	-	1	1	1	2	2
E-86	1	-	b	-	1	1	0	2	OM
E-95	5	-	cb	+	1	1	2	2	OM
E-96	1	-	bc	+	2	1	2	2	1
E-97	1	+	b	-	2	1	1	1	1
E-98	1	-	cb	+	2	1	2	2	1
E-99	5	-	cb	+	2	2	2	2	1
E-100	2	+	b	-	OM	1	2	2	OM
E-101	1	-	bc	-	OM	1	1	2	1
E-102	1	-	b	-	OM	1	2	2	1
E-103	1	-	b	-	OM	OM	1	2	0
E-104	2	-	bc	-	2	1	2	2	1
E-105	1	-	bc	+	2	2	2	2	1
E-106	1	+	b	-	1	1	2	2	OM
E-115	1	+	b	+	2	1	OM	1	1
E-116	1	+	b	+	2	1	1	1	1

Tabla 2.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
E-117	1	+	b	+	2	2	1	2	1
E-118	1	-	bc	+	2	2	2	2	1
E-119	1	-	bc	+	2	2	2	2	1
E-121	1	+	bc	+	2	2	1	1	1
E-122	1	+	bc	+	2	1	2	2	1
E-123	1	-	bc	+	2	1	2	2	1
E-124	1	-	b	-	1	OM	1	1	OM

IV.-3.- RIZOPLANA. Producción de vitaminas, solu-
bilización y características de Gram y morfología
de los microorganismos ensayados.

Tabla 3.- en las 12 páginas siguientes se exponen los resultados obtenidos sobre producción de vitaminas por microorganismos aislados de la rizoplasma. Se señala el número de bacterias (n), el comportamiento frente a la tinción de Gram, su morfología (c= cocos, cb= cocobacilos; bc= bacilos cortos; y b= bacilos). Se incluye además la propiedad de estos microorganismos para solubilizar fosfato bicalcico, en placa designandose como colonia positiva aquella que presenta un halo de solubilización y como negativa la que no lo presenta. Por último se reseñan los datos obtenidos acerca de la producción de vitaminas del grupo ^B. B₁₂ = vitamina B₁₂; P= pantenol; N= niacina; R= riboflavina y B= biotina. Los criterios que hemos utilizado en su valoración 0= negativa; OM= positiva al microscopio; 1 halo - de hasta 0,5 cm y 2 halos de 0,6 o más cm.

Tabla 3.-

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
G-57	1	-	cb	-	1	OM	1	1	1
G-58	1	-	c	+	2	1	OM	2	1
G-59	1	-	cb	+	2	2	1	1	1
G-60	1	-	c	+	2	1	1	1	1
G-61	1	-	cb	+	2	2	1	1	2
G-62	1	-	cb	+	2	1	2	2	1
G-63	1	+	b	-	1	OM	1	OM	1
G-64	1	-	c	-	1	1	1	OM	1
G-65	1	-	c	+	2	1	1	2	1
G-66	1	+	cb	-	2	1	2	2	1
G-67	1	-	b	+	2	2	1	2	2
G-68	1	-	bc	+	2	2	2	1	2
G-69	1	+	b	-	2	2	1	1	2
G-70	1	+	b	-	2	1	2	1	1
G-71	1	+	b	-	2	1	2	2	1
G-72	1	+	b	-	2	1	2	2	1
G-73	1	-	c	+	2	2	1	1	1

Tabla 3.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
G-74	1	-	b	-	2	1	1	2	1
G-75	1	-	cb	+	2	1	1	2	1
G-76	1	+	b	-	2	OM	1	2	2
G-77	1	-	cb	-	1	1	1	1	1
G-78	1	-	cb	+	2	2	1	1	2
G-79	1	-	cb	-	2	OM	1	1	1
G-80	1	-	cb	+	2	2	1	2	1
G-81	1	+	b	-	2	1	1	1	1
G-82	1	+	cb	-	OM	OM	1	OM	OM
G-83	1	+	b	-	OM	1	1	1	OM
G-84	1	+	b	-	1	1	1	1	OM
G-85	1	+	c	+	2	2	1	2	1
G-86	1	-	bc	-	2	1	1	1	1
G-87	1	-	cb	+	2	1	1	1	2
G-88	1	-	b	-	2	2	1	1	1
G-89	1	+	bc	-	1	1	1	1	1
G-90	1	-	cb	-	1	2	1	1	1

Tabla 3.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
G-91	1	-	cb	+	1	2	2	2	2
G-92	1	-	c	-	2	2	1	2	2
G-93	1	-	cb	+	1	2	2	2	2
G-94	1	-	cb	+	OM	2	1	2	1
G-95	1	-	cb	+	1	2	2	1	2
G-96	1	+	cb	+	1	2	2	2	1
G-97	1	-	cb	+	1	2	1	1	1
G-98	1	-	cb	+	1	2	1	2	1
G-99	1	-	c	+	2	2	1	2	1
G-100	1	-	cb	+	1	2	1	2	1
G-101	1	-	cb	+	1	2	1	2	1
G-102	1	-	b	-	1	2	2	2	1
G-103	1	-	b	-	1	2	1	0	1
G-104	1	+	b	-	OM	2	1	1	1
G-105	1	-	bc	+	1	2	2	2	2
G-106	1	-	bc	-	OM	2	1	1	1
G-107	1	-	cb	+	2	2	1	1	1

Tabla 3.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
G-108	1	+	c	-	1	2	1	1	1
G-109	1	+	cb	-	OM	OM	1	OM	OM
G-110	1	+	c	-	OM	OM	1	OM	OM
G-111	1	+	cb	-	OM	OM	OM	OM	OM
G-112	1	+	cb	-	2	2	1	1	1
G-114	1	-	bc	-	0	0	0	0	0
G-115	1	-	b	+	2	2	1	1	2
G-116	1	-	b	-	2	2	1	1	2
G-117	1	-	b	+	2	2	1	1	2
G-118	1	-	b	+	1	1	1	2	1
G-119	1	+	cb	-	OM	OM	1	1	OM
G-120	1	+	bc	-	1	2	1	1	1
G-121	1	+	b	+	1	1	1	1	1
G-122	1	-	b	+	OM	1	1	1	OM
G-123	1	-	b	+	1	1	1	1	1
G-124	1	-	b	+	1	1	1	1	1
G-125	1	-	b	+	1	1	1	OM	1

Tabla 3.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
L-31	1	-	b	-	1	1	1	1	1
L-32	1	-	bc	-	2	2	1	1	1
L-33	1	+	b	+	1	1	OM	1	OM
L-34	1	+	bc	-	1	OM	OM	1	OM
L-35	1	+	bc	-	1	OM	OM	1	OM
L-36	1	-	bc	-	1	1	1	1	1
L-37	1	-	b	-	1	2	2	1	1
L-38	1	-	bc	-	2	2	2	1	1
L-39	1	-	bc	-	1	1	OM	1	OM
L-40	1	+	v	+	OM	1	1	1	1
L-41	1	+	bc	-	2	2	1	1	1
L-42	1	-	bc	-	1	1	OM	1	2
L-43	1	-	bc	-	2	2	1	2	2
L-44	1	-	bc	-	1	1	1	1	OM
L-45	1	+	bc	-	OM	1	1	1	OM
L-46	1	+	bc	-	2	2	2	1	1
L-47	1	-	b	-	1	1	1	1	1

Tabla 3.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
L-49	1	-	b	-	1	1	1	OM	OM
L-50	1	+	b	+	2	2	2	1	1
L-51	1	-	bc	-	1	2	2	1	1
L-52	1	+	b	+	2	1	1	1	1
L-53	1	+	b	-	OM	1	2	1	1
L-54	1	+	b	-	OM	1	2	1	1
L-55	1	-	bc	+	2	2	1	2	2
L-56	1	-	b	-	2	1	1	OM	1
L-57	1	-	b	-	1	2	2	1	1
L-58	1	-	cb	-	OM	OM	1	1	1
L-59	1	+	c	-	1	1	1	1	1
L-60	1	-	b	-	1	1	1	OM	1
L-61	1	-	cb	-	OM	2	1	1	OM
L-62	1	-	cb	-	2	2	1	1	1
L-63	1	-	bc	+	1	1	1	1	1
L-124	1	-	cb	+	1	1	0	1	1
L-125	1	+	bc	+	1	1	0	1	1

Tabla 3.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
L-126	1	+	bc	+	2	1	1	2	1
L-127	1	+	bc	-	1	0-	OM	OM	1
L-128	1	+	bc	+	2	1	0	OM	1
L-129	1	+	bc	-	OM	1	OM	1	1
L-131	1	+	bc	-	OM	OM	0	1	1
L-133	1	-	b	+	2	1	OM	1	1
L-134	1	-	cb	+	1	OM	0	1	1
L-135	1	+	bc	+	2	2	2	2	1
L-136	1	-	b	-	2	1	1	1	1
L-137	1	-	bc	+	2	2	2	1	2
L-139	1	-	cb	+	1	1	0	1	1
N-13	2	-	bc	+	2	1	1	2	1
N-14	1	-	bc	+	2	1	1	1	1
N-15	1	-	b	+	2	1	1	1	1
N-16	1	-	bc	-	2	1	1	1	1
N-17	1	-	bc	+	2	1	1	2	2
N-18	1	-	bc	-	1	1	1	1	1

Tabla 3.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
N-19	1	+	b	+	1	1	1	1	1
N-20	1	-	cb	-	2	1	1	1	1
N-21	1	+	b	+	2	1	1	2	1
N-22	1	-	cb	-	2	1	1	2	1
N-23	1	+	b	-	1	1	1	1	1
N-24	1	-	bc	+	2	1	2	2	1
N-25	1	-	cb	+	2	1	1	2	1
N-26	6	-	cb	-	1	1	1	2	1
N-27	1	-	bc	+	2	1	2	2	1
N-28	2	-	b	+	1	2	2	1	1
N-29	1	-	bc	+	2	1	1	1	1
N-30	1	-	bc	+	2	2	1	1	1
N-31	1	+	b	-	2	1	1	1	1
N-32	1	-	bc	+	2	1	2	2	2
N-34	1	+	cb	-	2	1	1	2	1
N-35	1	+	c	-	1	1	1	1	1
N-36	1	+	b	-	1	1	2	1	1

Tabla 3.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
N-52	1	+	cb	+	2	1	2	2	1
N-53	7	-	b	-	1	1	2	1	1
N-54	4	+	b	+	2	1	2	2	1
E-19	1	-	b	+	1	1	2	1	1
E-20	1	-	b	-	2	1	2	2	1
E-21	21	-	b	+	1	1	1	2	1
E-22	1	+	c	-	1	OM	2	1	OM
E-23	1	-	b	-	2	1	1	1	OM
E-24	1	-	bc	-	2	2	1	2	2
E-25	1	-	bc	-	1	1	1	1	1
E-26	2	+	b	-	1	1	1	1	OM
E-27	2	+	b	-	1	1	1	2	0
E-28	1	-	b	-	2	1	1	2	1
E-41	3	+	bc	-	2	2	2	2	1
E-42	2	+	b	-	2	1	2	2	1
E-43	4	-	b	-	1	1	2	2	1
E-44	4	+	bc	+	1	1	2	2	1

Tabla 3.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
E-45	3	+	cb	-	1	1	2	2	1
E-46	1	+	cb	+	1	1	2	2	1
E-47	1	+	cb	-	1	1	2	2	1
E-48	1	+	bc	-	1	1	2	1	1
E-49	2	+	b	+	1	1	2	1	1
E-50	5	+	bc	-	2	1	2	1	1
E-51	2	-	cb	-	1	1	1	2	1
E-52	2	+	b	+	1	OM	1	1	1
E-53	1	+	b	-	1	1	2	2	1
E-73	7	-	b	-	1	1	1	1	OM
E-74	1	+	b	+	OM	1	1	1	OM
E-75	1	+	b	-	1	1	2	1	1
E-76	1	-	b	-	1	1	2	2	1
E-87	1	-	cb	+	1	1	1	2	1
E-88	2	-	bc	-	2	2	1	2	1
E-89	10	-	bc	-	2	1	0	2	OM
E-90	28	-	b	+	1	1	OM	2	OM

Tabla 3.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE VITAMINAS				
					B ₁₂	P	N	R	B
E-91	1	+	bc	-	2	2	2	2	1
E-92	1	+	bc	+	2	2	1	2	1
E-93	1	+	b	-	OM	1	1	2	OM
E-94	1	-	b	-	1	1	2	2	OM
E-107	3	-	b	-	OM	1	2	1	0
E-108	4	-	b	+	2	1	2	2	1
E-109	5	+	b	+	OM	1	2	2	0
E-110	1	-	cb	+	2	1	2	2	1
E-111	5	+	bc	+	2	2	2	2	1
E-112	5	+	bc	+	2	2	2	2	1
E-113	1	+	bc	-	2	1	1	2	OM
E-114	1	+	bc	+	2	2	2	2	2
E-125	1	-	bc	+	2	1	2	1	1
E-126	1	+	cb	+	2	2	1	2	2
E-127	1	-	cb	-	1	1	1	2	OM
E-128	2	-	b	+	2	1	1	2	1
E-129	1	-	cb	+	2	1	1	2	2

Tabla 3.- (continuación)

Nº	n	Gram	Morf.	Sol.	PRODUCCION DE AMINOACIDOS				
					B ₁₂	P	N	R	B
E-130	1	+	cb	-	OM	1	1	2	1
E-132	1	-	b	-	1	1	1	2	1

IV.4.- ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA. Resumen de los
resultados obtenidos.

Tabla 4.-

El total de los microorganismos analizados en la ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA es el siguiente.

Microorganismos Gram positivos	72	
Solubilizadores	45	62.50%
No solubilizadores	27	37.50%
 Microorganismos Gram negetivos	66	
Solubilizadores	54	81.81%
No solubilizadores	12	18.18%
 Total de microorganismos investigados ...	138	
Gram positivos	72	52.17%
Gram negativos	66	47.83%

Tabla 5.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -
Gram positivas en la ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA .

	OM	%	1	2	2	%	0	%
B ₁₂	12	16.66	19	26.38	37	51.38	4	5.55
P	19	26.38	23	31.94	25	34.72	5	6.94
N	14	19.44	28	38.88	20	27.77	10	13.88
R	4	5.55	40	55.55	14	19.44	14	19.44
B	33	45.83	35	48.61	0	0	4	5.55

Tabla 6.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -
Gram negativas en la ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	3	4.54	23	34.84	37	56.06	3	4.54
P	9	13.63	31	46.96	25	37.87	1	1.51
N	9	13.63	38	57.57	17	25.75	2	3.03
R	1	1.51	39	59.09	17	25.75	9	13.63
B	18	27.27	34	51.51	11	16.66	3	4.54

Tabla 7.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -
Solubilizadoras en la ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	11	11.11	30	30.30	51	51.51	7	7.07
P	22	22.22	38	38.38	35	35.35	4	4.04
N	18	18.18	42	42.42	29	29.29	10	10.10
R	3	3.03	61	61.61	21	21.21	14	14.14
B	36	36.36	47	47.47	11	11.11	5	5.05

Tabla 8.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -
No solubilizadoras en la ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	3	9.67	10	32.25	18	58.06	0	0
P	6	19.37	14	45.16	9	29.03	2	6.45
N	5	16.12	18	58.06	7	22.58	1	3.22
R	2	6.45	13	41.93	9	29.03	7	22.58
B	12	38.70	17	54.82	0	0	2	6.45

Tabla 9.-

Estudio de la producción de vitaminas en la ZONA CERCA

NA A LA RIZOSFERA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	15	10.86	42	30.43	74	53.62	7	5.07
P	28	20.28	54	39.13	50	36.23	6	4.34
N	23	16.66	66	47.82	37	26.81	12	8.69
P	5	3.62	79	57.24	31	22.46	23	16.66
B	51	36.95	69	50.00	11	7.97	7	5.07

IV.5.- RIZOSFERA. Resumen de los resultados obtenidos

Tabla 10.-

El total de microorganismos analizados en la RIZOSFERA

es el siguiente:

Microorganismos Gram positivos	137	
Solubilizadores	33	24.09%
No Solubilizadores	104	75.91%
Microorganismos Gram negativos	190	
Solubilizadores	74	38.94%
No Solubilizadores	116	61.05%
Total de microorganismos investigados	327	
Gram positivos	137	41.90%
Gran negativos	190	58.10%

Tabla 11.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -

Gram positivas en la RIZOSFERA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	17	12.40	56	40.87	59	43.05	5	3.64
P	10	7.29	101	73.72	23	16.77	3	2.18
N	11	8.02	83	60.58	39	28.45	4	2.91
R	8	5.83	73	53.28	56	40.86	0	0
B	37	27.00	85	62.04	12	8.74	3	2.18

Tabla 12.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -

Gram negativas en la RIZOSFERA .

	OM	%	1	%	2	%	0	0
B ₁₂	8	4.21	39	20.52	143	75.25	0	0
P	9	4.73	135	71.05	43	22.62	3	1.57
N	11	5.78	128	67.36	46	24.20	5	2.63
R	10	5.26	94	49.47	84	33.21	2	1.05
B	19	10.00	143	75.26	25	13.15	3	1.57

Tabla 13.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -
solubilizadoras en la RIZOSFERA

	OM	%	1	2	2	%	0	%
B ₁₂	2	1.87	14	13.08	91	85.05	0	0
P	4	3.74	58	54.20	43	40.19	2	1.87
N	1	0.93	54	50.47	50	46.73	2	1.87
R	1	0.93	31	28.97	75	70.09	0	0
B	8	7.47	77	71.96	22	20.56	0	0

Tabla 14.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -
no solubilizadoras en la RIZOSFERA

	OM	%	1	%	2	%	OM	%
B ₁₂	23	10.45	81	36.82	111	50.45	5	2.28
P	15	6.81	178	80.90	23	10.45	4	1.82
N	21	9.54	157	71.36	35	15.91	7	3.18
R	17	7.73	136	61.82	65	29.54	2	0.91
B	48	21.82	151	78.63	15	6.82	6	2.73

Tabla 15.-

Estudio total de bacterias de la RIZOSFERA. Producción de vitaminas

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	25	7.65	95	29.05	202	61.77	5	1.53
P	19	5.81	236	72.19	66	20.18	6	1.83
N	22	6.73	211	64.53	85	25.99	9	2.75
R	18	5.51	167	51.07	140	42.81	2	0.61
B	56	17.13	228	69.72	37	11.32	6	1.83

IV.6.- RIZOPLANA. Resumen de los resultados obteni-
dos.

Tabla 16.-

El total de microorganismos analizados en la RIZOPLA-

NA es el siguiente:

Microorganismos Gram positivos	107		
Solubilizadores	28	26.17%	
No Solubilizadores	79	73.83%	
Microorganismos Gram negativos	207		
Solubilizadores	112	54.11%	
No Solubilizadores	95	45.89%	
Total de microorganismos investigados.....	314		
Gram positivos	107	34.08%	
Gram negativos	207	65.92%	

Tabla 17.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -

Gram positivas en la RIZOPLANA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	21	19.62	38	35.51	48	44.85	0	0
P	13	12.14	65	60.74	28	26.15	1	0.93
N	7	6.54	40	37.38	57	53.26	3	2.80
R	7	6.54	47	43.92	53	49.52	0	0
B	18	16.82	77	71.96	5	4.66	7	6.54

Tabla 18.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -

Gram negativas en la RIZOPLANA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	8	3.89	127	61.35	71	34.28	1	0.84
P	5	2.41	158	76.32	43	20.76	1	0.84
N	31	14.97	120	57.97	41	19.79	15	7.24
R	5	2.41	76	36.71	124	59.90	2	0.96
B	52	25.60	128	61.83	22	10.59	4	1.93

Tabla 19.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -
solubilizadoras en la RIZOPLANA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	2	1.43	78	55.71	60	42.86	0	0
P	0	0	100	71.43	40	28.57	0	0
N	29	20.71	72	51.43	37	26.43	2	1.43
R	2	1.43	28	20.00	100	78.57	0	0
B	29	20.71	93	63.43	18	12.86	0	0

Tabla 20.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -
No Solubilizadoras en la RIZOPLANA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	27	15.51	87	50.00	59	33.91	1	0.57
P	18	10.34	123	70.69	31	17.82	2	1.15
N	9	5.17	88	50.57	61	35.06	16	9.19
R	10	5.75	95	54.60	67	38.50	2	1.15
B	42	24.14	112	64.37	9	5.17	11	6.32

Tabla 21.-

Estudio total de bacterias de la RIZOPLANA. Producción de vitaminas

	OM	%	1	%	2	%	OM	%
B ₁₂	29	9.24	165	52.55	119	37.89	1	0.32
P	18	5.73	223	71.02	71	22.61	2	0.64
N	38	12.10	160	50.95	98	31.21	18	5.73
R	12	3.82	123	39.17	177	56.37	2	0.64
B	71	22.61	205	65.28	27	8.59	11	3.50

IV. 7.- ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA, RIZOSFERA Y
RIZOPLANA. Resumen de los resultados ob-
tenidos.

Tabla 22.-

El total de microorganismos analizados en la ZONA CER-
CANA A LA RIZOSFERA, RIZOSFERA y RIZOPLANA, de acuer-
do con los datos anteriormente expuestos es el siguien
te:

Microorganismos Gram positivos	316	
Solubilizadores	106	33.54%
No Solubilizadores	210	66.45%
 Microorganismos Gram negativos	463	
Solubilizadores	240	51.84%
No Solubilizadores	223	48.16%
 Total de microorganismos investigados	779	
Gram positivos	316	40.56%
Gram negativos	463	59.44%

Tabla 23.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -
Gram positivas en la RIZOSFERA, RIZOPLANA y en la ZO-
NA CERCANA A LA RIZOSFERA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	50	15.82	113	35.76	144	45.57	9	2.85
P	42	13.29	189	59.81	76	24.05	9	2.85
N	32	10.13	151	47.78	116	36.71	17	5.38
R	19	6.01	161	50.63	123	38.92	14	4.34
B	88	27.85	197	62.34	17	5.38	14	4.34

Tabla 24.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias Gram
negativas en la RIZOSFERA, RIZOPLANA y en la ZONA CERCA-
NA A LA RIZOSFERA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	19	4.10	189	40.82	251	54.21	4	0.86
P	23	4.97	324	69.98	111	23.97	5	1.08
N	51	11.02	286	61.77	104	22.46	22	4.75
R	16	3.46	209	45.14	225	48.60	13	2.80
B	90	19.44	305	65.87	58	12.53	10	2.16

Tabla 25.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -
solubilizadoras en la RIZOSFERA, RIZOPLANA y en la ZO
NA CERCANA A LA RIZOSFERA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	15	4.34	122	35.26	202	58.38	7	2.02
P	26	7.51	196	56.65	118	34.10	6	1.73
N	48	13.87	168	48.55	116	33.53	14	4.05
R	6	1.73	120	34.68	206	59.54	14	4.05
B	73	21.10	217	62.72	51	14.74	5	1.44

Tabla 26.-

Estudio de la producción de vitaminas por bacterias -
no solubilizadoras en la RIZOSFERA, RIZOPLANA y en la
ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	53	12.47	178	41.88	188	44.23	6	1.41
P	39	9.18	315	74.12	63	14.82	8	1.88
N	35	8.24	263	61.88	103	24.24	24	5.64
R	29	6.82	244	57.41	141	33.18	11	2.59
B	102	24.00	280	65.88	24	5.65	19	4.47

Tabla 27.-

Estudio de la producción de vitaminas en el total de
bacterias de la RIZOSFERA, RIZOPLANA Y ZONA CERCANA A
LA RIZOSFERA.

	OM	%	1	%	2	%	0	%
B ₁₂	69	8.86	302	38.77	395	50.71	13	1.66
P	65	8.34	513	65.85	187	24.01	14	1.80
N	83	10.65	437	56.10	220	28.24	39	5.01
R	35	4.49	369	47.37	348	44.67	27	3.47
B	178	22.85	502	64.44	75	9.63	24	3.08

V ANALISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSION

V.- ANALISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSION

Al iniciar la discusión de los resultados obtenidos en el presente trabajo, creemos oportuno hacer algunas consideraciones acerca del medio de cultivo en que fueron aislados los microorganismos, así como del método de revelado.

1.- Medio de cultivo

Como se deduce de su composición (apartado III.3.4.) se trata de un medio empobrecido. Las bacterias capaces de desarrollarse en él, coinciden en sus requerimientos nutricionales con las que LOCHHEAD y CHASE (1943) incluyen en su grupo I; se trata de bacterias capaces de crecer en un medio mínimo de glucosa y sales minerales. Ello implica una capacidad de síntesis de sustancias probióticas en las bacterias aisladas.

Utilizando este medio, pretendemos aislar aquellos microorganismos, que de forma continua aportan factores de crecimiento al ecosistema, con lo cual favorecen el desarrollo de otros con necesidades nutricionales mucho más complejas.

2.- Método de revelado

Respecto del método utilizado en la determinación de la producción de vitaminas, consiste en una aplicación anteriormente descrito para el ensayo de - aminoácidos por diversos autores. En la técnica seguida RUIZ BERRAQUERO, BAYA y RAMOS-CORMENZANA (1973), cabe la posibilidad de que una interacción antagónica entre la cepa auxotrófica y el microorganismo ensaya- do interfiera en la lectura. No obstante se emplea con gran éxito en nuestro laboratorio en la investigación de vitaminas y aminoácidos.

Evidentemente carece de la precisión de los métodos cuantitativos, pero los resultados obtenidos son correctos, lo que se ha confirmado mediante expe- riencia previas, comprobando el comportamiento de las cepas auxotróficas frente a vitaminas puras.

Constituye un método de screening rápido - aplicable a amplios muestreos, lo que permite selec- cionar aquellos microorganismos con un nivel de produc- ción óptima.

Esto ofrece amplias posibilidades en el campo de la investigación industrial, para la selección de cepas y también en la determinación de sus condicio

nes óptimas de producción. Para investigar estas condiciones puede partirse de medios base, a los cuales adicionan distintos sustratos. Igualmente se ensayarán diferentes condiciones de temperatura, pH etc. En cada caso se comprobaría el nivel de producción de -vitaminas mediante la técnica de revelado. Estas determinaciones constituirían un paso previo en los ensayos a escala semi industrial.

3.- Estudio del porcentaje de bacterias que liberan -
vitaminas en el medio

Podemos observar que un elevado número de -
bacterias liberan vitaminas en el medio.

Si consideramos el total de microorganismos,
vemos que los valores oscilan entre el 98.34 % para -
la vitamina B₁₂ y el 94.94 % para la niacina, dando -
valores medios el pantenol, la biotina y la riboflavi
na.

Vitaminas	B ₁₂	P	B	R	N
Porcentajes	98.34	98.20	96.92	96.53	94.99

Si diferenciamos los grupos Gram negativos
y Gram positivos esta relación se mantiene.

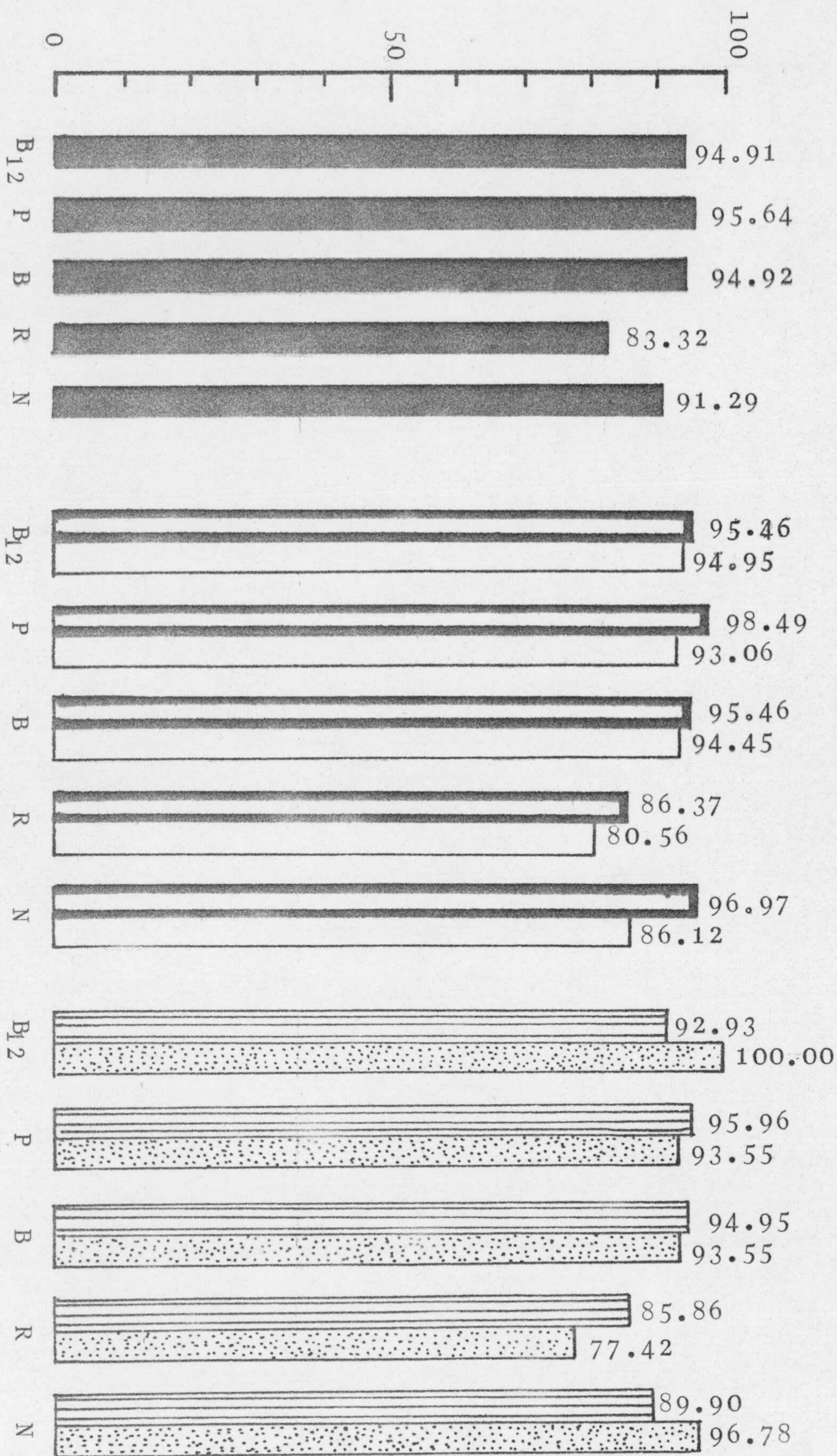
Vitaminas	B ₁₂	P	B	R	N
Gram (+)	99.15	98.92	97.84	97.20	95.25
Gram (-)	99.15	97.15	95.57	95.56	94.62

Al considerar aquellas bacterias con capacidad de solubilizar fosfatos observamos que el porcentaje de bacterias productoras de vitaminas sigue siendo alto.

Vitaminas	B ₁₂	P	B	R	N
Solubilizadoras	97.98	98.26	98.56	95.95	95.95
No Solubilizadoras	98.58	98.12	95.53	97.41	94.36

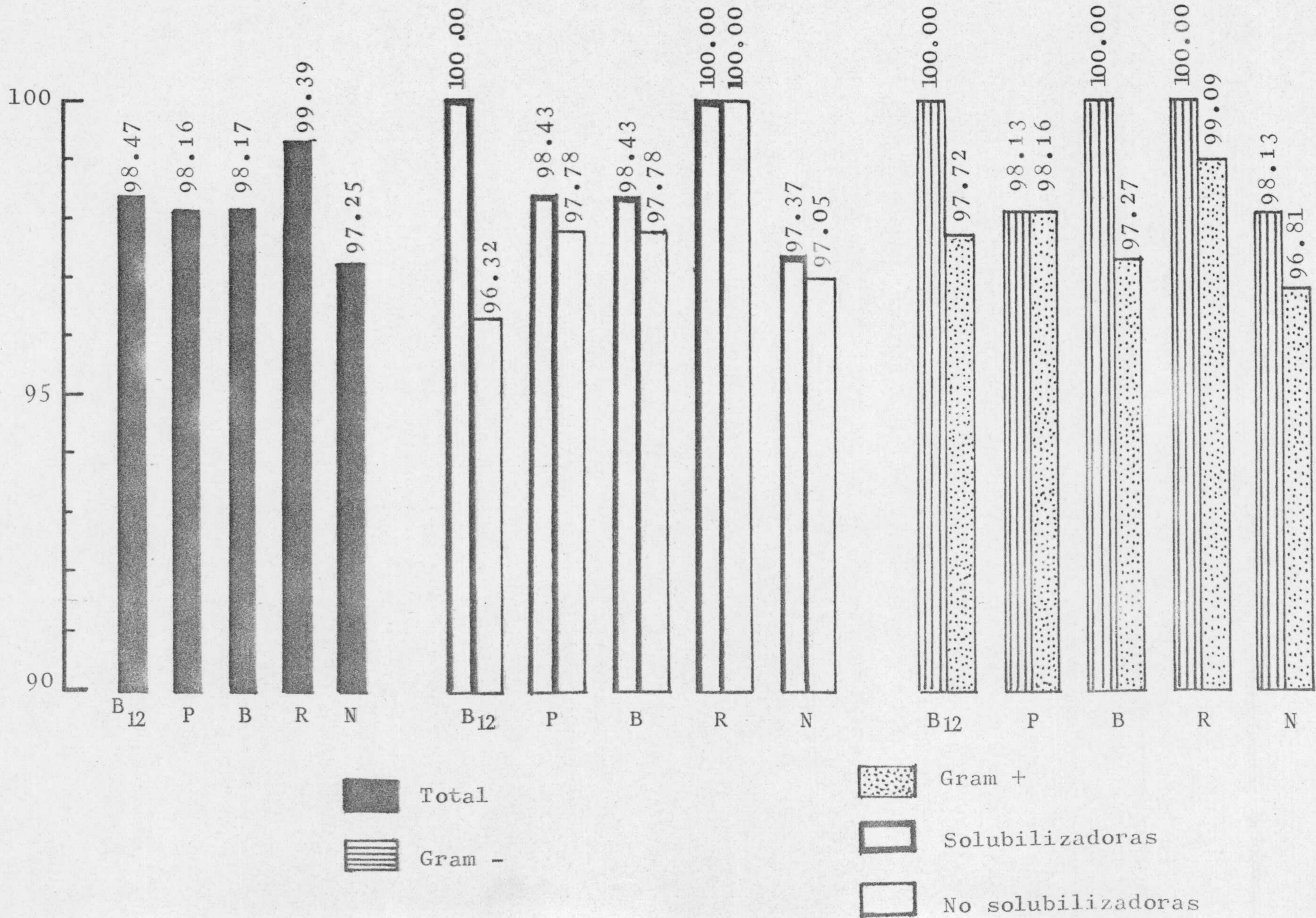
GRAFICA I

PRODUCCION TOTAL DE VITAMINAS POR BACTERIAS AISLADAS EN LA ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA



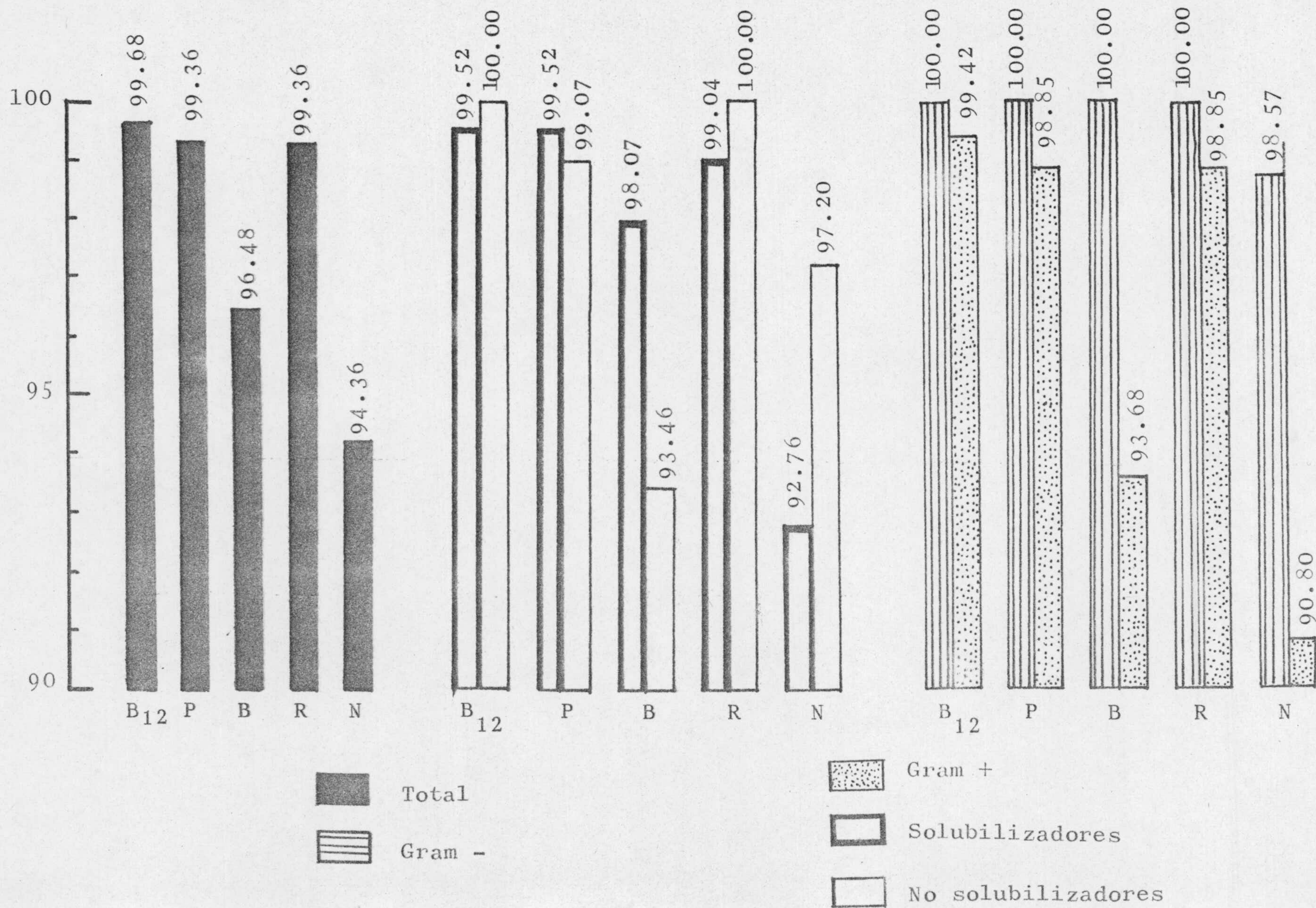
GRAFICA 2

PRODUCCION TOTAL DE VITAMINAS POR BACTERIAS DE LA RIZOSFERA.



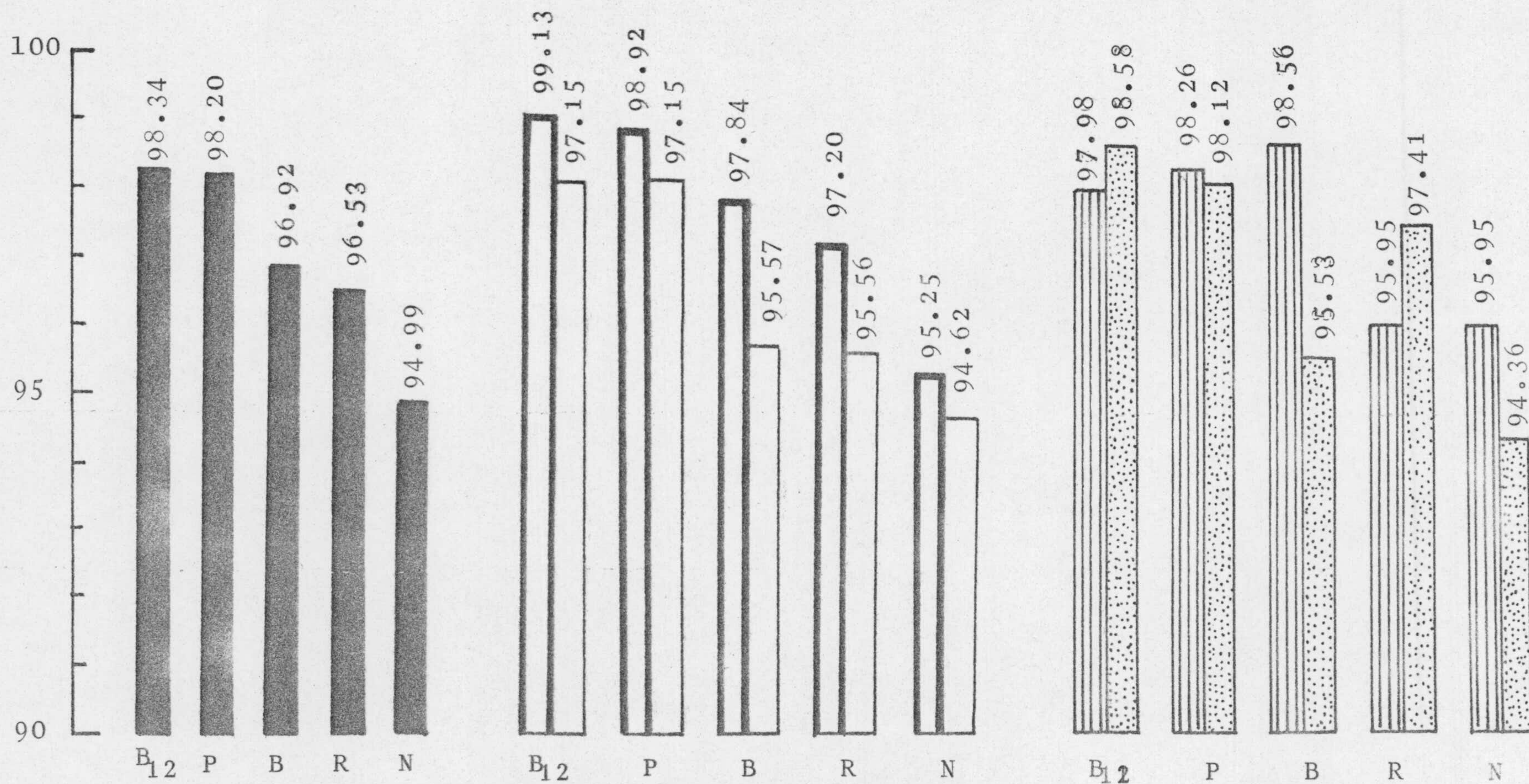
GRAFICA 3

PRODUCCION TOTAL DE VITAMINAS POR BACTERIAS DE LA RIZOPLANA



GRAFICA 4

PRODUCCION TOTAL DE VITAMINAS POR BACTERIAS AISLADAS
DE LA RIZOSFERA, RIZOPLANA Y ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA



Resumen del apartado V.3.

El porcentaje de microorganismos productores de vitaminas es muy elevado, tanto si consideramos el total de bacterias ensayadas (tabla 27, gráfica 4), como si nos limitamos a los diferentes grupos de bacterias: Gram (+), Gram (-), solubilizadoras y no solubilizadoras (tablas 23, 24, 25 y 26). Igualmente elevado resulta este porcentaje al considerar separadamente las bacterias correspondientes a las tres zonas estudiadas: zona cercana a la rizósfera (tabla 9, gráfica 1), rizósfera (tabla 15, gráfica 2) y rizoplana (tabla 21, gráfica 3).

4.- Estudio del porcentaje de bacterias que liberan -
vitaminas en el medio, a mayor nivel de producción. -
Indice de valoración 2.

Del estudio de las tablas y gráficas de resultados se desprende, que existen diferencias en los porcentajes de bacterias productoras de cada vitamina, al nivel que nosotros designamos con el índice 2. La vitamina B₁₂ es producida por un mayor número de cepas, el 50.71 % del total correspondiendo a la biotina el menor porcentaje, un 9.63 % (gráfica 5).

Estas diferencias subsisten en el mismo orden al comparar separadamente las cepas segun su comportamiento respecto a la tinción de gram y lo mismo sucede al diferenciar las cepas solubilizadoras y no solubilizadoras de fosfatos, si bien en cada caso los porcentajes varían.

Asi, en el grupo de cepas Gram positivas, un 45.57 % producen B₁₂ y un 5.38 % biotina, mientras que en las gram negativas, los porcentajes son 54.21 % para B₁₂ y 12.53 % para biotina. Entre las cepas solubilizadoras el 53.38 % corresponde a la B₁₂ y el 14.74 % a la biotina. En las no solubilizadoras la vitamina - B₁₂ figura con el 44.23 % y la biotina con el 5.65 %. Todos los porcentajes se refieren al nivel de producción 2.

En la gráfica 9 se representan los porcentajes de bacterias que producen a este nivel cada una de las vitaminas ensayadas. De mayor a menor porcentaje - figuran: vitamina B₁₂, riboflavina, niacina, pantenol y biotina.

Tabla 28.-

Cálculos de los estadígrafos de prueba

	n	x	p	1-p	$\frac{p(1-p)}{n}$
<u>vitamina B₁₂</u>	779	395	0.507	0.493	0.00032
<u>riboflavina</u>	779	348	0.447	0.553	0.00032
<u>niacina</u>	779	220	0.282	0.718	0.00026
<u>pantenol</u>	779	187	0.240	0.760	0.00023
<u>biotina</u>	779	75	0.096	0.904	0.00001

x = número de bacterias positivas para cada vitamina
n = número total de bacterias en la que se determino la vitamina

$$P = x/n$$

A continuación se calcula N (estadígrafo de prueba), para cada par de valores de p cuya significación queremos estimar. Los resultados obtenidos se incluyen en la tabla siguiente:

Tabla 29.-

	B_{12}	P	N	R	B
B_{12}	-----	<u>11.361</u>	<u>9.340</u>	<u>2.390</u>	<u>22.840</u>
P	<u>11.361</u>	-----	1.900	<u>8.810</u>	<u>9.290</u>
N	<u>9.340</u>	1.900	-----	<u>6.650</u>	<u>11.625</u>
R	<u>2.390</u>	<u>8.810</u>	<u>6.650</u>	-----	<u>19.280</u>
B	<u>22.840</u>	<u>9.290</u>	<u>11.625</u>	<u>19.280</u>	-----

Ya nos hemos referido en la introducción a la capacidad que tienen los microorganismos para sin·tetizar substancias probióticas, entre ellas vitaminas.

La diversidad de opiniones en cuanto a los porcentajes de microorganismos que producen vitaminas esta en relación con el medio de cultivo utilizado.- Las investigaciones llevadas a cabo por LOCHHEAD (1957) y LOCHHEAD y BURTON (1957), concuerdan con nuestros datos en cuanto a la mayor producción de riboflavina y vitamina B₁₂ y a una menor producción de biotina.

La menor producción de biotina, pantenol y niacina que hemos encontrado en nuestros resultados, la podriamos explicar por el hecho de que ellas son producidas por los exudados de raíces (ROVIRA y HARRIS, 1961).

La síntesis de vitaminas es mayor en la rizósfera. Es discutida su influencia sobre las plantas. En una revisión MACURA (1966), recoge la opinión de diversos autores, que a traves de investigaciones in vitro confirman este hecho, apreciando un aumento en el contenido en vitaminas en la planta.

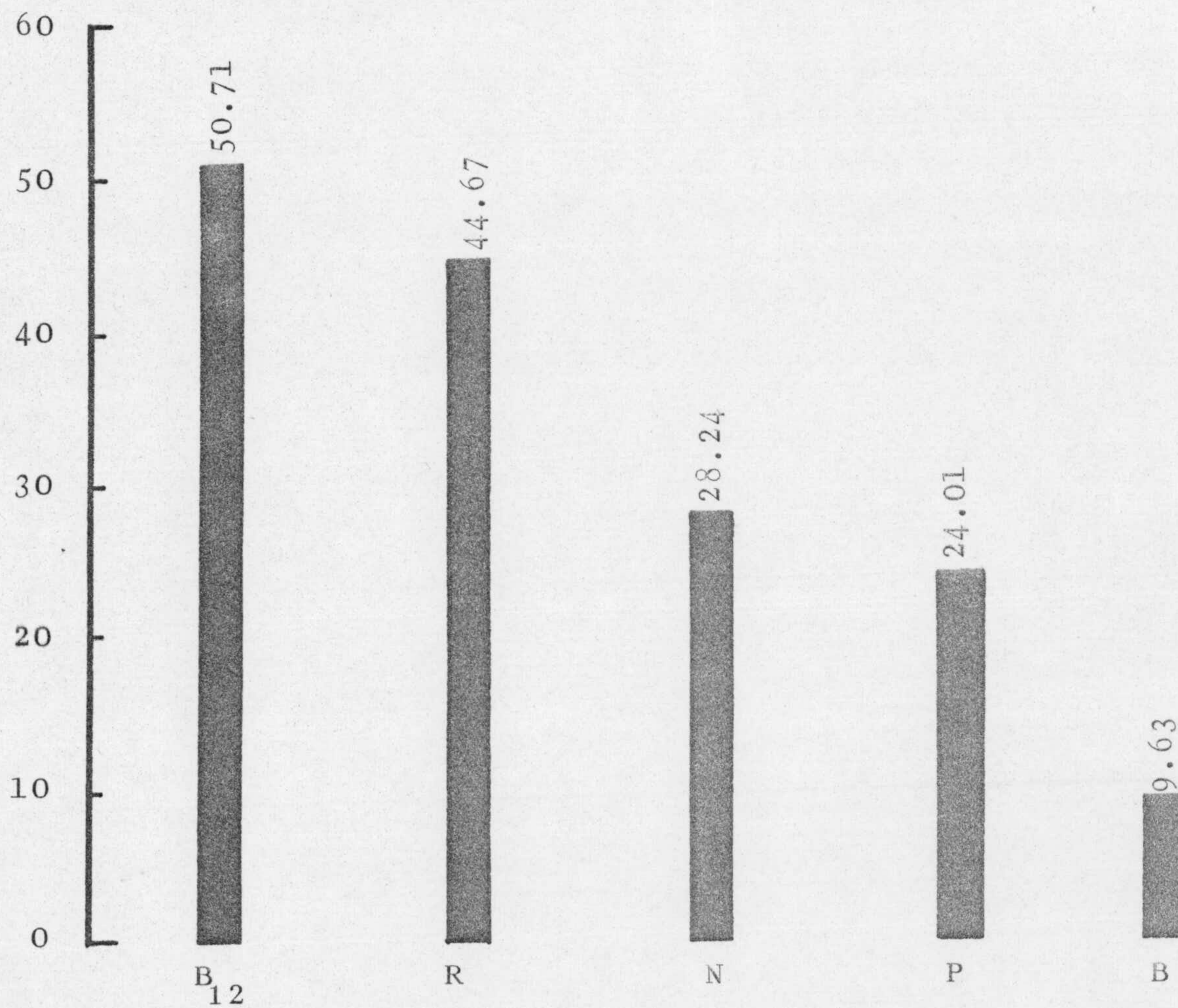
Estimamos sera de gran interes, seguir investigando las cepas N-44, aislada de la rizósfera y la E-114 aislada de la rizoplana ya que a su capaci-

dad de sintetizar todas las vitaminas se une la de solubilizar fosfatos, en cuanto a su posible utilización como fertilizante microbiano.

De hecho se sabe que el éxito de la bacterización depende de que la cepa se adapte eficazmente al medio edáfico por una parte y a la planta por otra. Estas cepas deben poseer un poder de colonización elevado que les permite instalarse y persistir en la rizósfera. También se podría pensar en asociaciones coloniaales que ofrecerían mejores resultados.

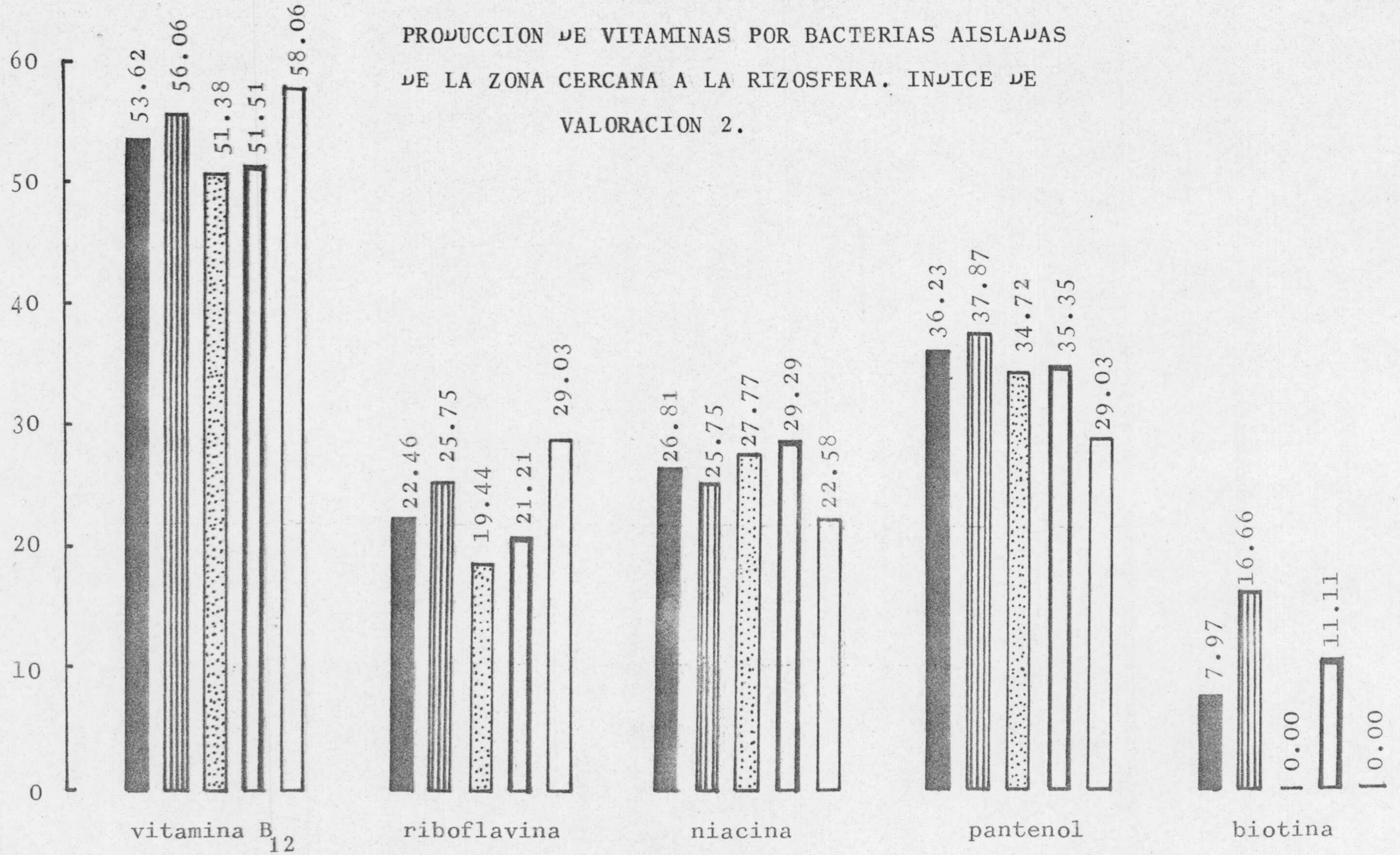
GRAFICA 5

PRODUCCION DE VITAMINAS POE EL
TOTAL DE BACTERIAS. INDICE DE VALORACION 2



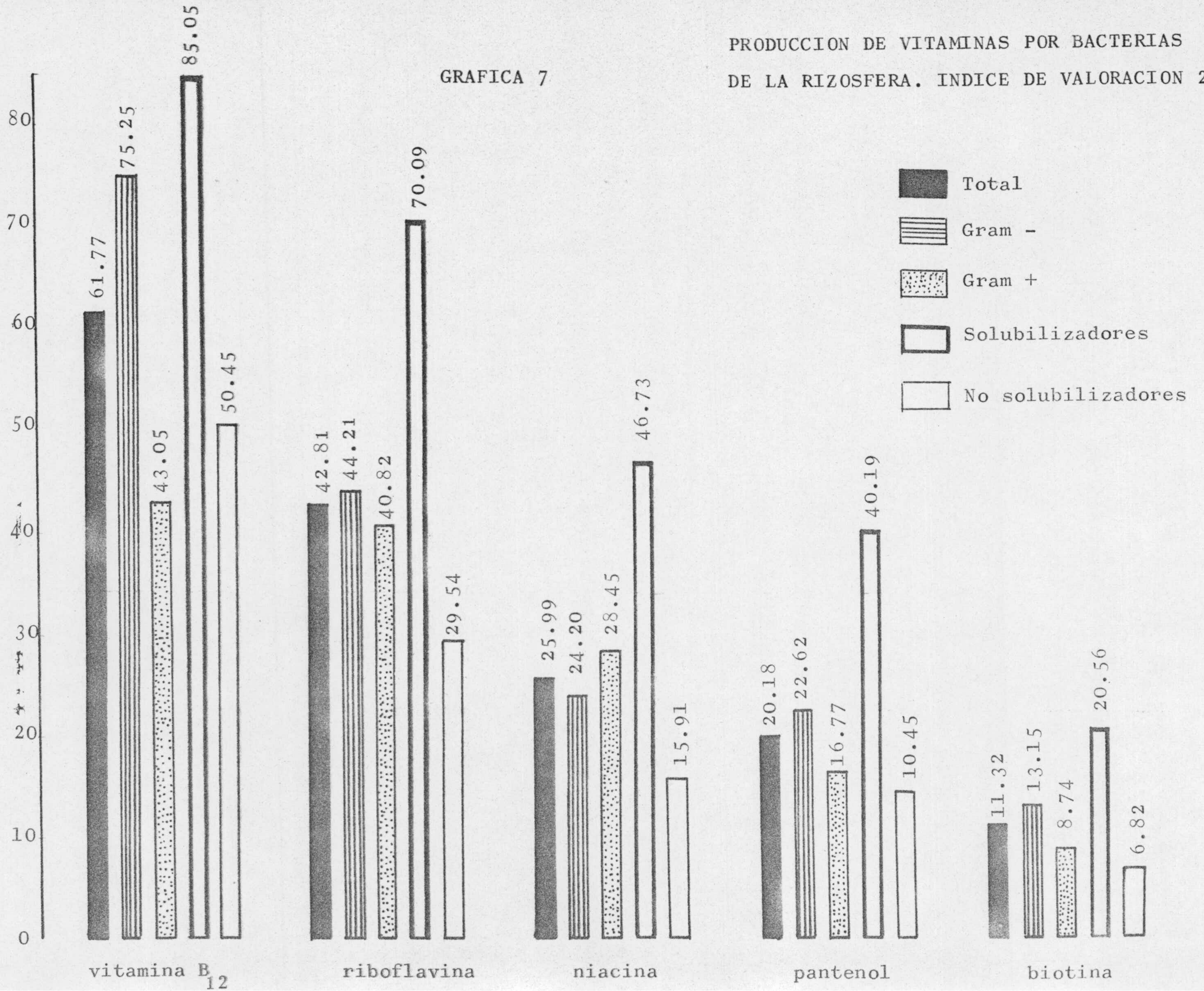
GRAFICA 6

PRODUCCION DE VITAMINAS POR BACTERIAS AISLADAS DE LA ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA. INDICE DE VALORACION 2.



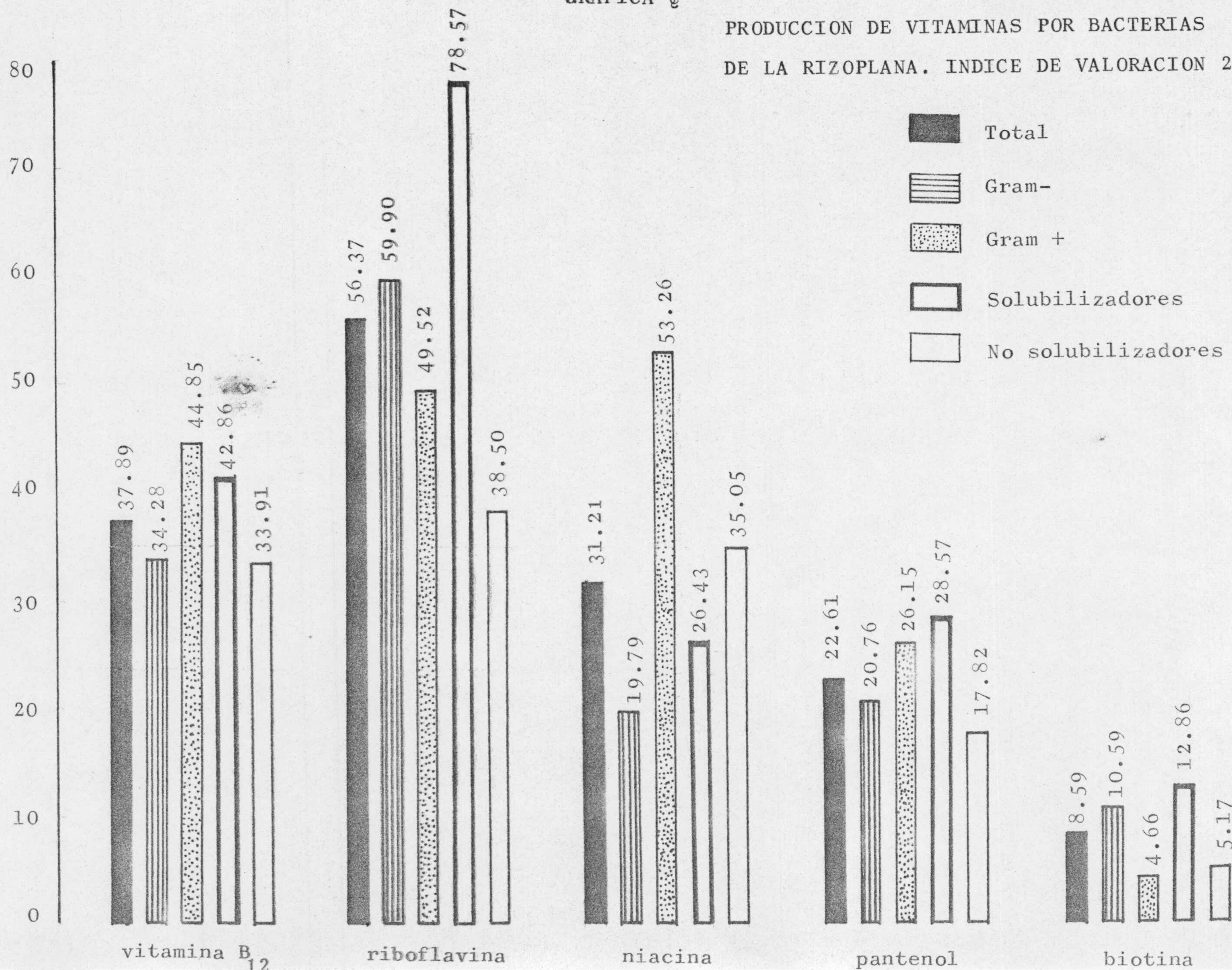
PRODUCCION DE VITAMINAS POR BACTERIAS
DE LA RIZOSFERA. INDICE DE VALORACION 2

GRAFICA 7



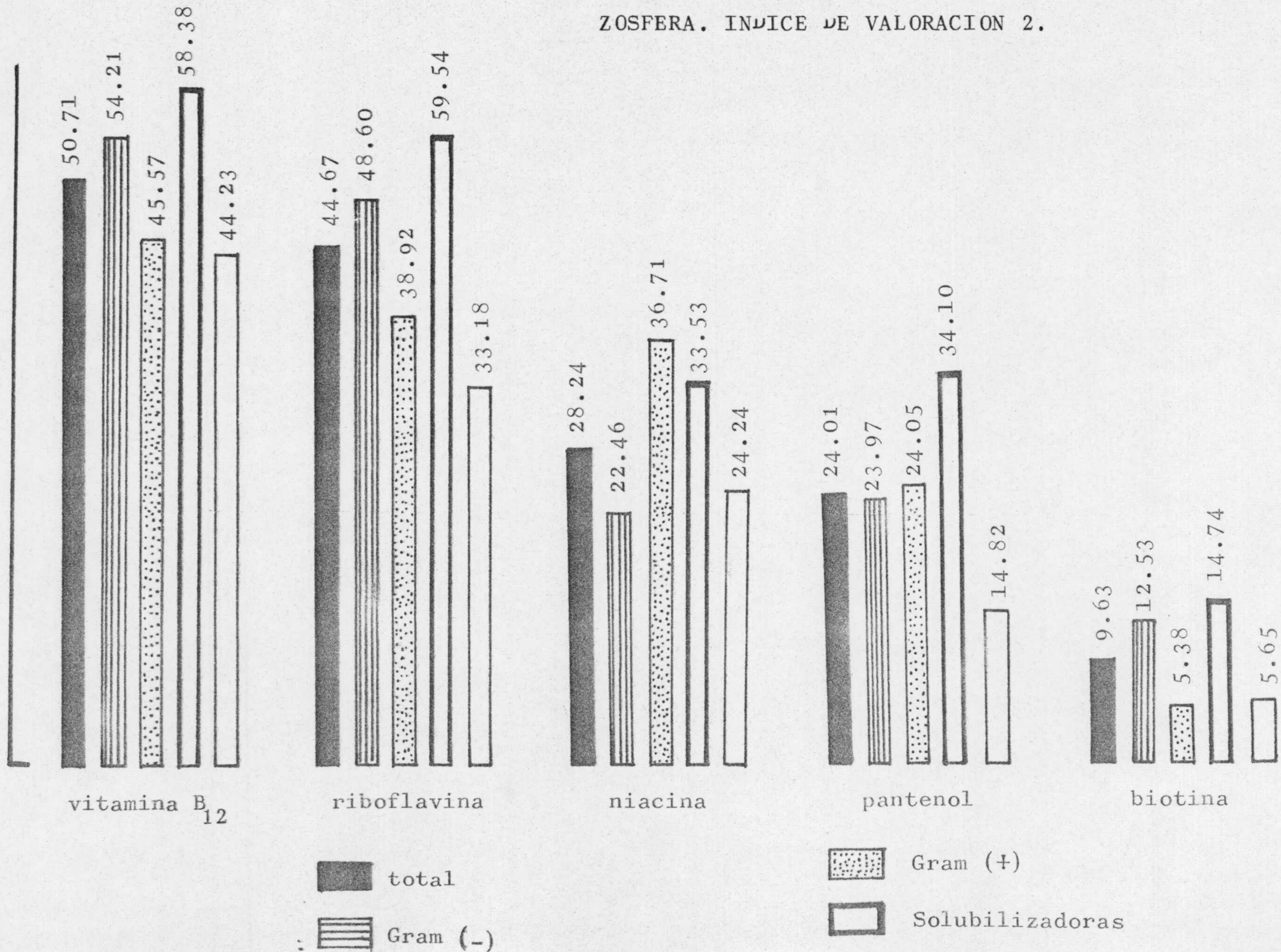
GRAFICA 8

PRODUCCION DE VITAMINAS POR BACTERIAS DE LA RIZOPLANA. INDICE DE VALORACION 2



GRAFICA 9

PRODUCCION DE VITAMINAS POR BACTERIAS DE LA RIZOSFERA, RIZOPLANA y ZONA CERCANA A LA RIZOSFERA. INDICE DE VALORACION 2.



Resumen del apartado V.4.

Se representan los estadígrafos de prueba - calculados para estimar si la diferencia de porcentaje es significativa. Los porcentajes estudiados corresponden a los obtenidos para el total de bacterias que dieron valoración 2, en las 5 vitaminas ensayadas.

Se encuentran subrayados aquellos casos en los que la diferencia es significativa (estadígrafo de prueba mayor a 1.96, con un 95 % de confianza) -- (tabla 29).

En relación al porcentaje de microorganismos productores de cada una de las vitaminas ensayadas y al mayor nivel de producción (valoración 2), se puede observar (gráfica 5) que:

El porcentaje mayor de microorganismos corresponde a productores de vitamina B₁₂, le siguen en proporción decreciente los productores de riboflavina, niacina y pantotenato, siendo el porcentaje menor el correspondiente a la biotina. Las diferencias de porcentajes son significativas (tabla 29).

Esta relación se mantiene en la mayoría de los casos al considerar los diferentes grupos de Gram (+), Gram (-), solubilizadores y no solubilizadores , tanto para el conjunto de microorganismos (gráfica 9),

como si se consideran separadamente las tres zonas es
tudiadas: zona cercana a la rizósfera (gráfica 6),
rizósfera (gráfica 7) y rizoplana (gráfica 8).

En todo caso se puede afirmar que es la bio
tina , la vitamina de las estudiadas producida por me
nor número de bacterias.

4.- Estudio del total de microorganismos solubilizados y no solubilizadores a los niveles de producción de vitaminas 1 y 2.

Si observamos los porcentajes correspondientes a cada nivel de producción (tabla 31), observamos diferencias entre ellos.

Asi a nivel 1 tenemos que el porcentaje de microorganismos no solubilizadores es mayor que el de solubilizadores:

<u>B₁₂</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>B</u>
59.33	61.64	61.02	67.03	56.34

Al nivel 2 el porcentaje de solubilizadores es mayor que el de no solubilizadores.

<u>B₁₂</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>B</u>
51.79	65.19	52.97	59.37	68.00

Tambien se observa que el porcentaje de solubilizadores aumenta al pasar de nivel 1 a nivel 2.

vitamina	<u>B₁₂</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>B</u>
nivel 1	40.67	28.36	38.98	32.97	43.66
nivel 2	51.59	65.19	52.97	59.37	68.00

Como consecuencia lógica el número de no so
lubilizadores decrece al pasar de nivel 1 a 2.

Cálculo de los estadígrafos de prueba

x = número de bacterias positivas

n = número total de bacterias en que se determinó la prueba.

$$p = X / n$$

	n	x	p	$1-p$	$\frac{p(1-p)}{n}$
<u>Vitamina B₁₂</u>					
Valoración 1	300	122	0.407	0.593	0.0008
valoración 2	390	202	0.518	0.482	0.0006
<u>Pantenol</u>					
Valoración 1	511	196	0.384	0.616	0.00046
valoración 2	181	118	0.652	0.348	0.00125
<u>Niacina</u>					
Valoración 1	431	168	0.390	0.610	0.00055
valoración 2	219	116	0.530	0.470	0.00114
<u>Riboflavina</u>					
Valoración 1	364	120	0.330	0.670	0.00061
valoración 2	347	206	0.594	0.406	0.00070
<u>Biotina</u>					
Valoración 1	497	217	0.347	0.563	0.00050
valoración 2	75	51	0.680	0.320	0.00029

A continuación se calcula N (estadígrafo - de prueba) para cada par de valores p cuya significación queremos estimar.

Tabla 30.-

Diferencias de porcentajes de microorganismos solubilizadores entre los niveles 1 y 2

para :	vitamina B ₁₂	<u><u>2.968</u></u>

	Pantenol	<u><u>6.473</u></u>

	Niacina	<u><u>3.406</u></u>

	Riboflavina	<u><u>7.333</u></u>

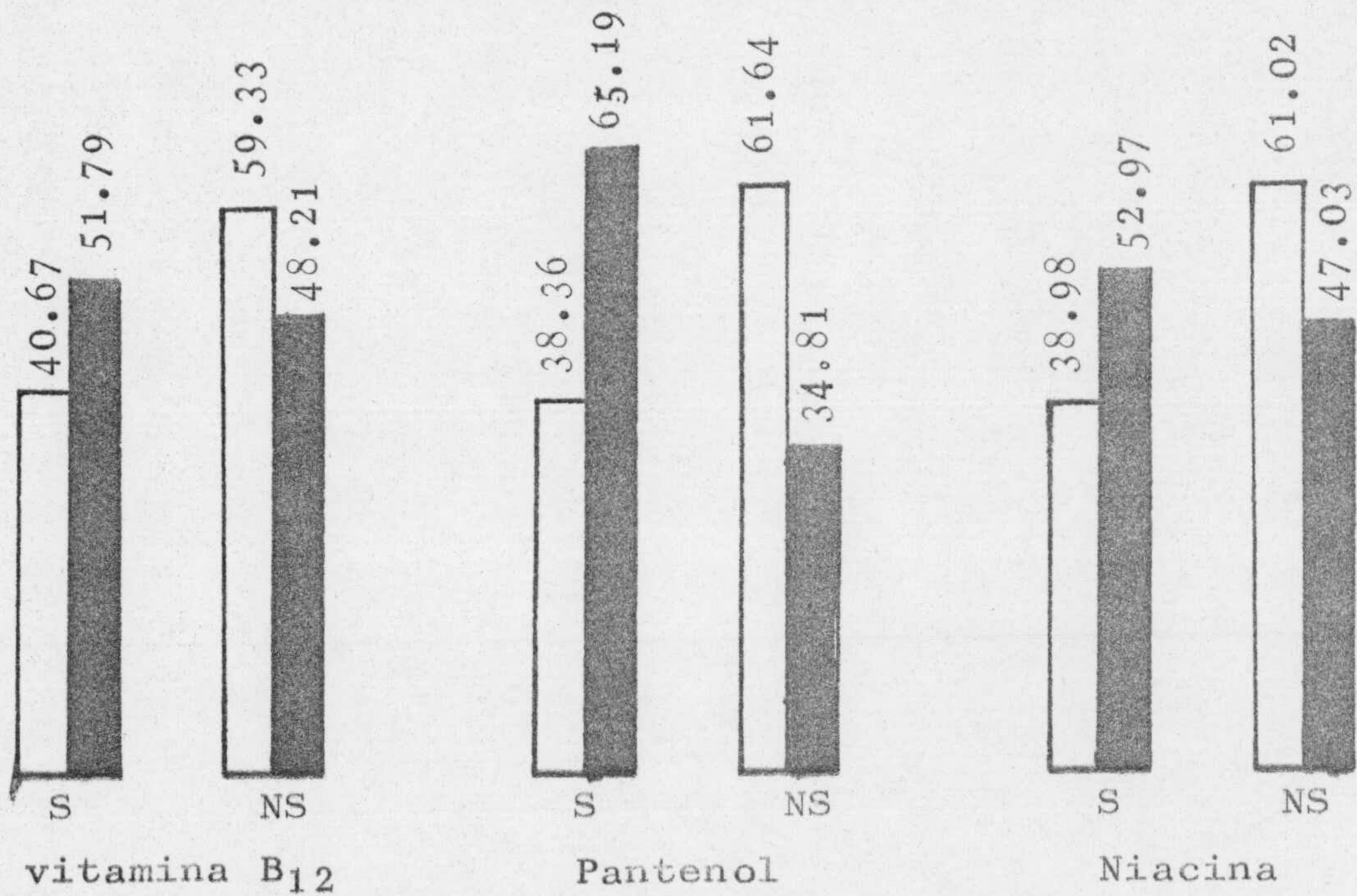
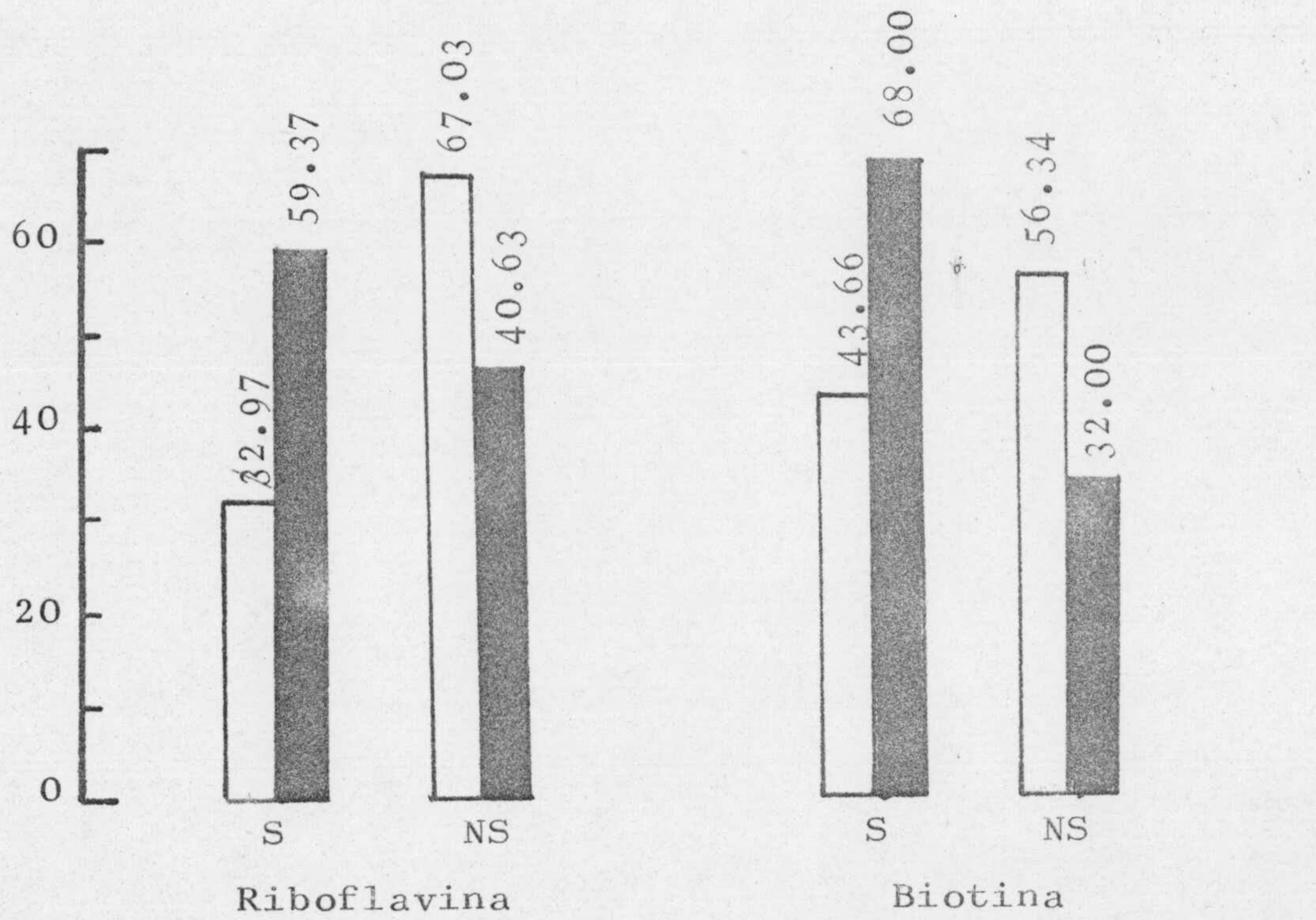
	Biotina	<u><u>4.190</u></u>

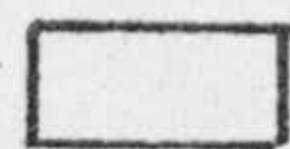

Tabla 31

Produccion de vitaminas por el total de microorganismos solubilizadores y no solubilizadores a los niveles 1 y 2

	<u>VALORACION I</u>				<u>VALORACION II</u>			
	<u>No Solubiliz.</u>		<u>Solubiliz.</u>		<u>No Solubiliz.</u>		<u>Solubiliz.</u>	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
B ₁₂	178	59.33	122	40.67	188	48.21	202	51.79
P	315	61.64	196	38.36	63	34.81	118	65.19
N	263	61.02	168	38.98	103	47.03	116	52.97
R	244	67.03	120	32.97	141	40.63	206	59.37
B	280	56.34	217	43.66	24	32.00	51	68.00

GRAFICA 10



 Valoración 1
 Valoración 2

MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES
Y NO SOLUBILIZADORES A LOS NI-
VELES 1 y 2.

Resumen del apartado V.4.

Considerando los microorganismos que producen las vitaminas ensayadas (valoraciones 1 y 2) y el carácter solubilizador o no solubilizador de los mismos, se puede comprobar que el mayor porcentaje de productores de vitaminas al nivel superior 2, corresponde a los microorganismos solubilizadores.

Asi si observamos la tabla 31, gráfica 10, podemos ver que por cada vitamina los porcentajes de no solubilizadores son superiores a los solubilizadores al nivel de producción 1 , mientras que al nivel 2 ocurre lo contrario. De igual manera se observa que el porcentaje de solubilizadores crece al pasar del nivel de producción 1 al 2 , mientras que decrece el de no solubilizadores. Estas diferencias de porcentajes resultan altamente significativas (tabla 30).

6.- Producción de vitaminas y solubilización de fosfatos.

Basándonos en la relación entre capacidad de solubilizar fosfatos y producción de aminoácidos, descrita por RUIZ-BERRAQUERO (1974) (en los microorganismos de la zona cercana a la rizosfera ; se trata de -- las mismas bacterias por nosotros estudiadas), hemos investigado la posibilidad de un hecho semejante considerando la solubilización de fosfatos respecto a la producción de vitaminas. De los resultados por nosotros obtenidos, no se desprende la existencia de tal-relación.

Tampoco hemos encontrado relación entre producción de aminoácidos y de vitaminas. Creemos de interés hacer resaltar las cepas S-92 (Proteus sp.), S-34 (Pseudomonas sp), A-94 (Bacillus lentus) y 80 (Bacillus coagulans), los cuales unen a su capacidad de solubilizar fosfatos, un excelente nivel de producción de vitaminas y aminoácidos.

VI CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- Un medio de cultivo empobrecido para el aislamiento de microorganismos productores de vitaminas, ha demostrado ser altamente eficaz.
- 2.- La técnica de revelado en placa para determinar la producción de vitaminas ha dado excelentes resultados.
- 3.- En las tres zonas estudiadas, la cifra de microorganismos productores de vitaminas es elevada.
- 4.- En la rizósfera es estadísticamente significativa la relación entre la solubilización de fosfatos y la producción de vitaminas.
- 5.- El nivel dos (explicado en apartado III.13), --- muestra una proporción de solubilizadores estadísticamente superior al nivel 1 (explicado en apartado III-13).
- 6.- Entre los microorganismos que segregan al medio cantidades apreciables de vitaminas
 - a) la vitamina B₁₂ es la mas fuertemente producida
 - b) la riboflavina, pantenol y niacina dan valores

menores, pero tambien elevados.

c) la biotina es la vitamina menos fuertemente originada

7.- Las cepas N-44 y E-114 aisladas de la rizósfera y rizoplana respectivamente, unen a su capacidad de solubilizar fosfatos, un alto nivel en cuanto a la producción de las cinco vitaminas ensayadas.

8.- Las cepas S-92 (Proteus sp.), S-34 (Pseudomonas sp.), A-94 (Bacillus lentus) y 80 (B. coagulans), aisladas de la zona cercana a la rizósfera, que en otros trabajos han demostrado ser productoras de aminoácidos y solubilizadoras de fosfatos, son asi mismo excelentes segregadoras de vitaminas.

VII BIBLIOGRAFIA

VII. - BIBLIOGRAFIA

ABOUD-ZEID, A.Z.A. (1972). Production of vitamin B₁₂ by Streptomyces sp. Indian J. Exp. Biol., 10, 155.
Ref: Microbiol. Abst., 7B, N° 10700 (1972).

AGNIHOTRI, V.P. (1970). Solubilization of insoluble phosphate by some soil fungi isolated from nursesey seedbeds. Can. J. Microbiol., 16, 877.

ALEXANDER, M. (1967). Introduction to soil microbiology. Wiley and Sons, Inc. London.

ALEXANDER, M. (1971). Biochemical ecology of microorganisms. Ann. Rev. Microbiol., 25, 361.

ANDREYUK, E.I. y KOGAN, S.B. (1967). Synthesis of vitamins by soil Actinomycetes. Mikrobiologiya, 36, 227.

ANDREYUK, E.I. y KOZLOVA, I.A. (1971). Correlation - between pigment formation and vitamin formation in - soil Mycobacteria. Mikrobiologiya, 40, 628.

AQUORONE, E. y PICCI, G. (1961). Alcune ricerche sulla biosintesi della riboflavina da parte della microflora del terreno. Agricoltura Ital., 61, 252.

AZCON, R. ; BAREA, J.M. y CALLAO, V. (1973). Selección de microorganismos movilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno para utilizarlos como fertilizantes biológicos en cultivos enarenados. Cuad. C. Biol., 2, 23.

BAGDASARIAM, E.G. (1965). Production of vitamin B₁₂ - by soil bacteria. Mikrobiologiya, 34, 502.

BAJPAI, P.D. y RAO, W.V.B.S. (1971 a). Phosphate solubilising bacteria. Part 2. Extracellular production of organic acid by selected bacteria solubilising insoluble phosphate. Soil Sci. and Plant Nutrition, 17, 44.

BAJPAI, P.D. y RAO, W.V.B.S. (1971 b). Phosphate solubilising bacteria. Part 1. Solubilisation of phosphate in liquid culture by selected bacteria as affected by different pH values. Soil. Sci. and plant Nutrition, 17, 41.

BERSHOVA, O.I. y KOZLOVA, I.A. (1962). " Vitamin synthesis by some rhizosphere microorganisms and the effect of trace elements 2 ". Microbiol. Zh. 24(5), 15 .
Ref: Soil and fertilizers, 27(5), N°2821 (1963).

BLONDEAU, R. (1968). Cinétique de l'évolution des aci

des aminés et des vitamines hydrosolubles dans la rhizosphère des plantules de colza (Brassica napus oleifera). C.R. Acad. Sc. Paris. D. 266, 2017.

BOONER, J. y GREENE, J. (1938). Vitamin B₁ and the -- growth of green plants. Bot. Gaz., 100, 226.

BOONER, J. y GREENE, J. (1939). Further experiments -- on the relation of vitamin B₁ to the growth of green plant. Bot. Gaz. 101, 491.

BONNET, A. (1966). Sur la production of biotine et the riboflavine par différentes souches d'Agrobacterium tumefaciens (Smith et Town) Conn. Ann. Inst. Pasteur, 111(1) , 57.

BURTON, M.O. y LOCHHEAD, A.G. (1951). Studies on the production of vitamin B₁₂ active substances by micro-organism. Can. J. Bot., 29, 325.

BURTON, M.O. y LOCHHEAD, A.G. (1952). Production of vitamin B₁₂ by Rhizobium species. Can. J. Bot. 30, 521.

BHUNANESWARI, K. y SULOCHANA, C.B. (1955). Assay of root exudates. Curr. Sci., 24, 376.

CARPENTER, C.C. (1943). Riboflavin vitamin B₁₂ in soil Science, 98, 109.

CHHONKAR, P.K. y SUBBA-RAO, N.S. (1967). Phosphate solubilization by fungi associates with legume root nodules. Can. J. Microbiol., 13, 749.

CLOTTEY, R. ; GUINEA, J. y PARES-FARRAS, R. (1968). Segregación de aminoácidos por una cepa de C.intermedium. Microbiol. Españ., 21, 155.

DAMERY, J.T. y ALEXANDER, M. (1969). Physiological differences between effective and ineffective strains of Rhizobium. Soil. Sci. 108, 209.

DANIELS, H. (1970). Some factors influencing vitamin B₁₂ production by Pseudomonas denitrificans. Can. J. Microbiol., 16, 809.

DARKEN, M.A. (1953). Production of vitamin B₁₂ by microorganisms and its occurrence in plant tissue. Botan. Rev., 19, 99.

DEMAIN, A.L. (1972). Riboflavin oversynthesis. Ann. Rev. Microbiol. 26, 369.

DIFCO (1966). Supplementary literature. Difco laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

DORING, H. (1961). " It is possible to increase the vi tamin contents of plants by fertilizers ? ". Dtsch. Laudw., 12, 69. Ref: Soil and Fertilizers, 27(5) , N^o 2034 (1962).

DOUDOROF, J.M. (1938). Lactoflavin and bacterial lumini nescence. Enzymologie, 5, 239.

DUDA, J. ; MALIŪSKA, E. y PEDZIIWILK, Z. (1957). The relationships between the vitamin B₁₂ content and the numbers of microorganisms in soil. Acta Microbiol. -- Polon., 6 , 355. Ref: Soils and Fertilizaes 22(3), N^o 1136 (1958).

DUFF, R.B. y WEBLEY, D.M. (1959). 2-ketogluconic acid as a natural chelator produced by soil bacteria. Chem and Ind., 137, 1377.

DUFF, R.B. ; WEBLEY, D.M. y SCOTT, R.O. (1963). Solu- bilization of minerals and related materials by 2- -- ketogluconic acid producing bacteria. Soil Sci., 95, 105.

DOMERGUES, Y. y MANGENOT, F. (1970). *Écologie microbienne du sol*. Ed. Masson, Paris.

ELLIS, B. ; PETROW, V. y SNOOK, G.F. (1949). *J. Pharm. Pharmacol.*, 1, 60. Ref: KOSER, S.A. (1968). *Vitamin requirements of bacteria and yeast*. Charles C. Thomas Publisher. Springfield, Illinois.

ESTERMAN, E.F. y MC LAREN, A.D. (1961). Contribution of rhizoplane organisms to the total capacity of plants to utilize organic nutrients. *Plant and Soil*, 15, 243.

EPANCHINOV, A.V. (1970). " Effect on mineral fertilizers on accumulation of B vitamins in soils in the rooting zone of maize." *Pochovedenie*, 5, 68. Ref: *Soils and Fertilizers*, 34(1), N° 564, (1971).

EPANCHINOV, A.V. (1971). " Effect of mineral fertilizers on acumulation of B vitamins in soil of the rooting zone of plants." *Pochovedenie*, 1 , 69. Ref: *Soils and Fertilizers*, 34(4), N° 2770 (1971).

FOSTER, J.W. (1943). Microbiological aspects of riboflavin. I Introduction. II. Bacterial oxidation of -- riboflavin to lumichrome. *J. Bacteriol.*, 47, 27.

- FOSTER, J.C. ; LALLY, J.A. y WODRUFF, H.H. (1949).
Cup assay with vitamin B₁₂ as a standar. Science, 110
509.
- FURUSAKA, K.A.CH. (1968). " Studies on the activity
of sulfate reducer in Paddy soil. ". Bull. Inst. Agr.
Res. Tohoku Univ., 19, 101.
- GUERRETSEN, F.C. (1948). The influence of microorga --
nisms on the phosphate uptake by the plant. Plant and
Soil, I, 51.
- GEORGIEVA, J. y SHEIKOVA, G. (1963). Vitamin B₁₂ forma
tion from various Actynomycetes isolated from Bulgarian
sils. Fol. Microbiol. 8, 322. Ref: Soils and Fertilizers,
Nº 301, 27(1) (1963).
- GREAVES, M.P. y WEBLEY, D.M. (1965). A study of the -
breakdown of organic phosphate by the root region of -
certain pasture grasses. J. Appl. Bact., 28(3), 454.
- GUPTA, I.P. y DAS, N.B. (1961). Nutritive value of ---
maize as influenced by manures and fertilizers II. Vi-
tamins and aminoacids. Indian J. Agric. Sci., 31, 47.
Ref: Soils and Fertilizers, Nº 3395, 24(6), (1961)
- GYLLENBERG, H. y HACKMAN, R. (1960). Effect of growth

rate on the production of vitamin B₁₂ active substances by soil bacteria. Experiments with a strains of Pseudomonas. Acta Agric. Scand., 10, 177.

HAGEDON, H. (1969). Investigation on the relationships between the distribution of thiamin in podzols and --- their microflora. Plant and Soil, 31, 161.

HANNAPEL, R.J. ; FULLER, W.H. y FOX, R.M. (1964). Phosphorus movement in a calcareous soil II. Soil microbial activity and organic phosphorus movement. Soil Sci., 97, 421.

HARRISON, M.J. ; PACHER, R.E. y MORITA, R.I. (1972). Solubilization of inorganic phosphates by bacteria isolated from upper klammath lake sediment Limnol.Oceanogr. 17, 50. Ref: Microbiol. Abst. 7B, Nº 9637 (1972).

HATTORI, T. (1973). Microbial life in the soil. An Introduccion. Marcel Dekker, inc. New York.

HEATLEY, N.G. (1944). Biochem. J. 38, 61. Ref: FOSTER, J.C. y col (1949). Science. 110, 509.

HOUSTON, M.R. y MC VEGH, I. (1973). Biosynthesis of - thiamine by Phycomyces blakesleeanus. Can. J. Microbiol. 19(2), 949.

JANSEN, B.C.P. y DONATH, W.I. (1926). Proc. Koninklijke Akad. Wetenschappen, Amsterdam, 29, 1390. Ref: KOSER, S.A. (1968).

KATZNELSON, H. y ROUATT, J.W. (1957 a). Studies on the incidence of certain physiological groups of bacteria in the rhizosphere. Can. J. Microbiol. 3, 265.

KATZNELSON, H. y ROUATT, J.W. (1957 b). Manometric studies with rhizosphere and non rhizosphere soil. Can. J. Microbiol., 3, 673.

KOGL, F. (1938). Chem. and Ind., 57, 49. Ref: KOSER, S.A. (1968).

KOGL, F. y HAAGEN-SMIT, A.J. (1936). Biotin and aneurin als phytohormona. Ztschr. Physiol. Chem., 243, 209. Ref: SCHMIDT, E.L. (1950). Soil Sci., 71, 129.

KOGL, F. y TONIS, B. (1936). Über das biosproblem --- darstellung von krystalliseerten biotin aus eigelb. Z. Physiol. Chem., 242, 43, Ref: PETERSON, W.H. y PETERSON, M.S. (1945). Bact. Rev., 9, 49.

KOGL, F. y VAN WAGTENDOK, W.J. (1938). Über die bedeutung von biotin für das wachstum von Staphylococcus pyogenes aureus. Rec. Trav. Chim., 57, 745. Ref: Chem.

Abst. 33, N° 682 (1939).

KOROBKOVA, T.P. ; MAKSIMOVA, T.S. ; KOVSHAROVA, J.N.
y TEREKHOVA, L.P. (1971). "Production of antibiotic
antimetabolites of aminoacids and vitamins by -----
Actinomycetes. Antibiotiki., 16, 36. Ref: Microbiol.
Abst., 6A, N° 11299 (1971).

KRASILNIKOV, N.A. (1958). Soil microorganisms and ---
higher plants. Trad Engl. Office of technical services.
U.S.A. dept. of comerce. Washington. Ref: DOMERGUES, Y.
y MANGENOT, F. (1970).

KUHN, R. ; GYORGY, P. y WAGNER-JAUREGG, T. (1933). ---
Berichte Deut. Chem. Gesellsch. 66, 317. Ref: KOSER, S.
A. (1968).

KUHN, R. ; REINEMUD, ; WEYGARD, y STROBELE, (1935)
Berichte Deut. Chem. Gesellsch., 68, 1765. Ref: KOSER,
S.A. (1968).

LEVIN, A.P. ; FUNK, H.B. y TENDLER, M.D. (1954). Vitamin
B₁₂ rhizobia and leguminous plant. Science, 120, 784.

LILLY, V.G. y LEONIAN, L.H. (1939). Vitamin B₁ in soil.
Science, 89, 292.

LILLY, D.M. ; STILLWELL, R.H. (1945). Science, 89, 292.
Ref: PRAMER, D. (1968). The ecology of soil bacteria.
An International Symposium. Gray Parkinson ed. Liver-
pool Univ. Press.

LOCHHEAD, A.G. y CHASE, F.E. (1943). Qualitative studies
of soil microorganisms: V. Nutritional requirements of
the predominant bacterial flora. Soil Sci., 55, 185.

LOCHHEAD, A.G. y BURTON, M.O. (1956). Soil as an habi-
tat of vitamin requiring bacteria. Nature, 178, 144.

LOCHHEAD, A.G. y THEXTON, R.H. (1952). Qualitative stu-
dies of soil microorganisms. X. Bacteria requiring B₁₂
as growth factor. J. Bacteriol. 63, 219.

LOCHHEAD, A.G. y THEXTON, R.H. (1951). Vitamin B₁₂ as
a growth factor for soil bacteria. Nature, 167, 1034.

LOUW, H.A. (1970). A study of the phosphate-dissolving
bacteria in the root region of wheat and lupin. Phyto-
phylactica, 2, 21. Ref: Microbiol. Abst., 7B, N° 6244
(1972).

LOUW, H.A. y WEBLEY, D.M. (1959). A study of soil bac-
teria dissolving certain mineral fertilizers and rela-
ted compounds. J. Appl. Bacteriol., 22, 277.

MACURA, J. (1966). Rapport général. Ann. Inst Pasteur, 111, 9.

MAHNOUD, S.A.Z. ; ABDEL-HAFEZ, A.M. ; EL SAWY, M. y --
HANAFY, E.A. (1973). " Inorganic insoluble phosphat --
dissolving bacteria in soils of Egypt and rhizosphere -
of broad bean and wheat. ". Agrokém. Talajtan, 22, 351.
Ref: Microbiol. Abst., 9A, N° 4034 (1974).

MAN, J.C.DE. ; ROGOSA, M. y SHARPE, M.E. (1960). A me-
dium for the cultivation of Lactobacilli. J. Appl. --
Bacteriol., 23, 130.

MEHTA, I.R. y BHIDE, V.P. (1970). Solubilization of tri
calcicum phosphate by some fungi. Indian J. Exp. Biol.,
8, 228.

MELIN, E. y RAMA DAS, V.S. (1954). Physiol. Plant., 7,
851. Ref: ROVIRA, A.D. (1962). Soils and Fertilizers.,
25(3), 167.

MESHKOV, N.V. (1960). The effect of thiamine and biot
ne on the development of certain soil microbes. -----
Mikrobiologiya, 28, 894.

METZGER, W.I. (1947). Microbic descomposition of panto
tenic acid. J. Bacteriol., 54, 135.

MEYER, K. (1944). The relationship of lysosyme to avin. Science, 99, 391.

MIL'KO, E.S. y RABOTNOVA, I.C. (1969). Riboflavin production by some mycobacterial species on a medium --- with n-hexadecane. Mikrobiologiya, 38(2), 264.

MIRICK, G.S. (1943). The oxidation of p-aminobenzoic acid and antranilic acid by specifically adapted enzymes of a soil Bacillus. J. Exp. Med., 78, 255.

NESTEROVA, G.N. (1958). Trud. Vses N.-i. inst. s.ch. mikrobiol., 15, 128. Ref: MACURA, J. (1966).

NOWOTNY-MIECZYNSKA, A. y GOLEBIOWSKA, J. (1956). The influence of microbial population on the phosphorus uptake by some crop plants. Acta Microb. Polon., 5, 129. Ref: Soils and Fertilizers, 20, No 601 (1957).

PANTOS, G. (1961). Agrokém. talajtan., 10, 511. Ref: MACURA, J. (1966).

PAUL, N.B. y SUNDARA RAO, W.V.B. (1971). Phosphate dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. Plant and Soil, 35, 127.

PETERSON, W.H. y PETERSON, M.S. (1945). Relation of --

bacteria to vitamins and other growth factors. Bact. Rev., 9, 49.

PRAMER, D. (1968). The ecology of soil bacteria. An International Symposium. Gray Parkinson ed. Liverpool Univ. Press.

RAGHU, K. y MACRAE, I.C. (1966). Occurrence of phosphate-dissolving microorganisms in the rhizosphere of --- rice plants and in submerged soils. J. Appl. Bact., 29, 582.

RAMOS, A. y CALLAO, V. (1967). El empleo de la solubilización de fosfatos como técnica diferencial bacteriana. Microbiol. Españ., 20, 1.

RAMOS, A. ; CALLAO, V. y DE CARVALHO, P.C.T. (1968). La solubilización de fosfatos por hongos del suelo. --- Microbiol. Españ. 21, 23.

REMPKE, E.KH. (1973). The role of vitamins synthesised by root microflora for the plants. Fiziol. Rast. 19(3), 663. Ref: Microbiol. Abst. 8A, Nº 7741 (1973).

RICKES, E.L. ; BRINK, N.G. ; KONIUZY, F.R. ; WOOD, T.R. y FOLKERS, K. (1948). Crystalline vitamin B₁₂. Science, 107, 396.

RIVIERE, J. (1960). Les besoins en vitamines du group B des bactéries du sol. Ann. Agron. Paris., 11, 331.

ROBBINS, W.H. ; HERVEY, A. y STEBBINS, M.E. (1950). Estudied on Euglena and vitamin B₁₂. Bull. Torrey Botan. Clus., 77, 423.

ROULET, M.A. (1948). Recherches sur les vitamins du sol. Experientia, 4, 149.

ROULET, M.A. y SHOPFER, W.H. (1950). Les vitamines du sol et leur signification. Trans. Inter. Congres. Soil Sci., 4th Cong., Amsterdam. 1, 202.

ROVIRA, A.D. (1962). Plant root exudates in relation to the rhizosphere microflora. Soils Fertil. Harpenden, 15, 167.

ROVIRA, A.D. (1965). Interactions between plant roots and soil microorganisms. Ann. Rev. Microbiol., 19, 241.

ROVIRA, A.D. y HARRIS, J.R. (1961). Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. V. The -- exudation of B group vitamins. Plant and Soil., 14, 199.

ROBBINS, W.H. y BARLEY, (1937). Science, 85, 246. Ref: LILLY, V.G. y LEONIAN, L.H. (1939).

RUIZ-BERRAQUERO, F. (1974). Estudio de la segregación de aminoácidos y solubilización de fosfatos por microorganismos del suelo. Tesis doctoral Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

RUIZ-BERRAQUERO, F. ; BAYA, A.M. y RAMOS-CORMENZANA, A. (1973). Study on bacteriological method for vitamins an the detection of aminoacids. 1st International Congress for Bacteriology, Jerusalem.

SANDRAK, N.A. (1971). Effect of extracelular secretion of Azotobacter and other microorganisms. Mikrobiologiya, 40, 691.

SANKARAM, A. y SUNDARA RAO, W.V.B. (1962). Synthesis of vitamin B₁₂ by soil bacteria. Curr. Sci., 31, 334.

SAUNDERS, A.P. ; OTTO, R.H. y SYLVESTER, J.C. (1952). The production of vitamin B₁₂ by various strains of Actinomycetes, J. Bacteriol., 64, 527.

SCHMIDT, E.L. (1950). Soil microorganisms and plant growth substances I. Historical. Soil Sci., 71, 129.

SHAVLOVSKY, G.M. (1954). Dokl Akad. Nauk SSSR, 85, 1101. Ref: MACURA, J. (1966).

SHAVLOVSKY, G.M. (1955) Izd. Akad. Nauk SSSR, Moscou.
Ref: MACURA, J. (1966).

SHEMAKHANOVA, N.M. y OLEINIKOV, R.R. (1972). The liberation of pyridoxine into the medium by the cells of nodule bacterial strains with a high and a low activity. Mikrobiologiya, 41, 256.

SHEMAKHANOVA, O.D. y SIDORENKO, O.D. (1971). "Contents of some B group vitamins in the root nodules of leguminous plants bacterized with Rhizobium strains of varying activity. Akad. Nauk. SSSR Ser. Biol., 13, 148. Ref: Microbiol. Abst. 6B, N° 14295 (1971).

SHOPFER, W.H. (1943). Plant and vitamins. Chronica Botanica Co., Waltham, Massachusetts.

SHOPFER, W.H. (1952). Les vitamines du sol. En perspectives nouvelles dans la chimie des êtres vivants.

SMALLII, V.T. (1959). The formation of vitamins in the wheat rhizosphere. Zh. Microbiol. Kiev., 21, 25. Ref: Soils and Fertilizers, 23(3), N° 1177 (1959).

SMALLII, V.T. (1960). Mikrobiol. Zh., 22, 20. Ref: MACURA, J. (1966).

SMITH, E.L. (1948). Nature, 161, 638. Ref: KOSER, S.A. (1968).

SMITH, E.L. y PARKER, L.S. (1948). Purification of antipernicious anemia factor. Proc. Biochem.Soc., Biochem J., 43, viii-ix. Ref: KOSER, S.A. (1968).

SNELL, E.E. y STRONG, F.M. (1939). A microbiological - assay for riboflavin. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 11, 346.

SPERBER, J.I. (1957). Solution of mineral phosphates by soil bacteria. Nature, 180, 994.

STARKEY, R.L. (1942). Transformation of riboflavin and pantothenic acid during decomposition of plant material. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 7, 237.

STARKEY, R.L. (1944). Changes in the content of certain B vitamins in organic materials decomposing under aerobic and anaerobic conditions. Soil Sci., 57, 247.

STARKEY, R.L. (1958). Interrelations between microorganisms and plant roots in the rhizosphere. Bacteriol. Rev., 22, 154

STEINBERG, B.I. ; GEBGARDT, A.G. y DATZIUK, N.M. (1974)

Synthesis of vitamins of B group by Achromobacter cobalamini sp.nov. Mikrobiologiya, 43, 495.

STOKLASA (1909). Ref: O. VERONA. Microbiologia Agraria. Edit. U.T.E.T.

SULOCHANA, C.B. (1962) . B vitamins in root exudates of cotton. Plant and Soil, 16, 327.

SUNDARA RAO , W.V.B. y VENKATARAMAN, K.V. (1963). Estudied on the rhizosphere microorganisms of wheat. -- Indian J. Agric. Sci., 33, 163

SUNDARA RAO, W.V.B. ; BAJPAI, P.D. ; SHARMA, J.P. y - SUBBIAH, B.V. (1963). Solubilising organisms using - P³² as tracer and the influence of seed bacterization on the uptake by the crop. Indian Soc. Soil Sci., 11, 209.

SZEGI, J. (1966). "Effect of different plant material - on the synthesis of some vitamins of the group B in - soil!" Agrokém. Talajt., 15, 523. Ref: Soils and Ferti- lizers, 30, N° 2497 (1967).

SZEGI, J. y GULYAS, F. (1964). " Data on the accumula- tion of some vitamins in soil ". Agrokém. Talajt., - 13, 281. Ref: Soils and Fertilizers, 28, N° 2455, - (1965).

TARDIEUX-ROCHE, A. (1966). Contribution a l'etude des interactions entre phosphates naturels et microflore

du sol. Theses Faculté des Sciences Univ. Paris.

TOMASHEVSKAIA, E.G. y MANZON, V.D. (1961). Trud. Inst. Mikrobiol., 9, 260. Ref: MACURA, J. (1966).

UDAKA, S. (1960). Screening method for microorganisms - accumulating metabolites and its use in the isolation of Micrococcus glutamicus. J. Bacteriol., 75, 754.

VOZNYAKOVSKAYA, YU.M. (1961). Trud. Inst. Mikrobiol., 11, 56. Ref: MACURA, J. (1966).

VOZNYAKOVSKAYA, YU.M. y AVRORA, N.P. (1968). Effect of fertilizers on the growth of microorganisms producing vitamins in wheat rhizosphere. Mikrobiologiya, 37(1), 131.

VYAS, S.R. y PRASAD, N. (1955). Production of vitamin B₁₂ by Rhizobia in Guyarat soil. J. Sci. Ind. Research (India)., 15C, 52.

WEST, P.M. (1939). Excretion of thiamin and biotin by the roots of higher plants. Nature, 144, 1050.

WHITE, P.R. (1937). Plant Physiol., 12, 803. Ref: ---
LILLY, V.G. y LEONIAN, L.H. (1939).

WHITE, P.R. (1946). Plant tissue cultures II. Botan. Rev., 12, 521.

WIJMENGA, H.G. ; LENS, J. y MIDDLEBEEK, A. (1949). --
Chem. weekblad, 45, 342. Ref: KOSER, S.A. (1968).

WILLIAM, R.P. y KOSER, S.A. (1947). Bacterial destruc
tion of thiamine. Jour. Infect. Diseases, 81, 130.

WILLIAMS, R.J. ; LYMAN, C.M. ; GOODYEAR, G.H. ; ----
TRUESDAIL, J.H. y HOLADAY, D. (1933). J. Am. Chem Soc.,
55, 2912. Ref: KOSER, S.A. (1968).